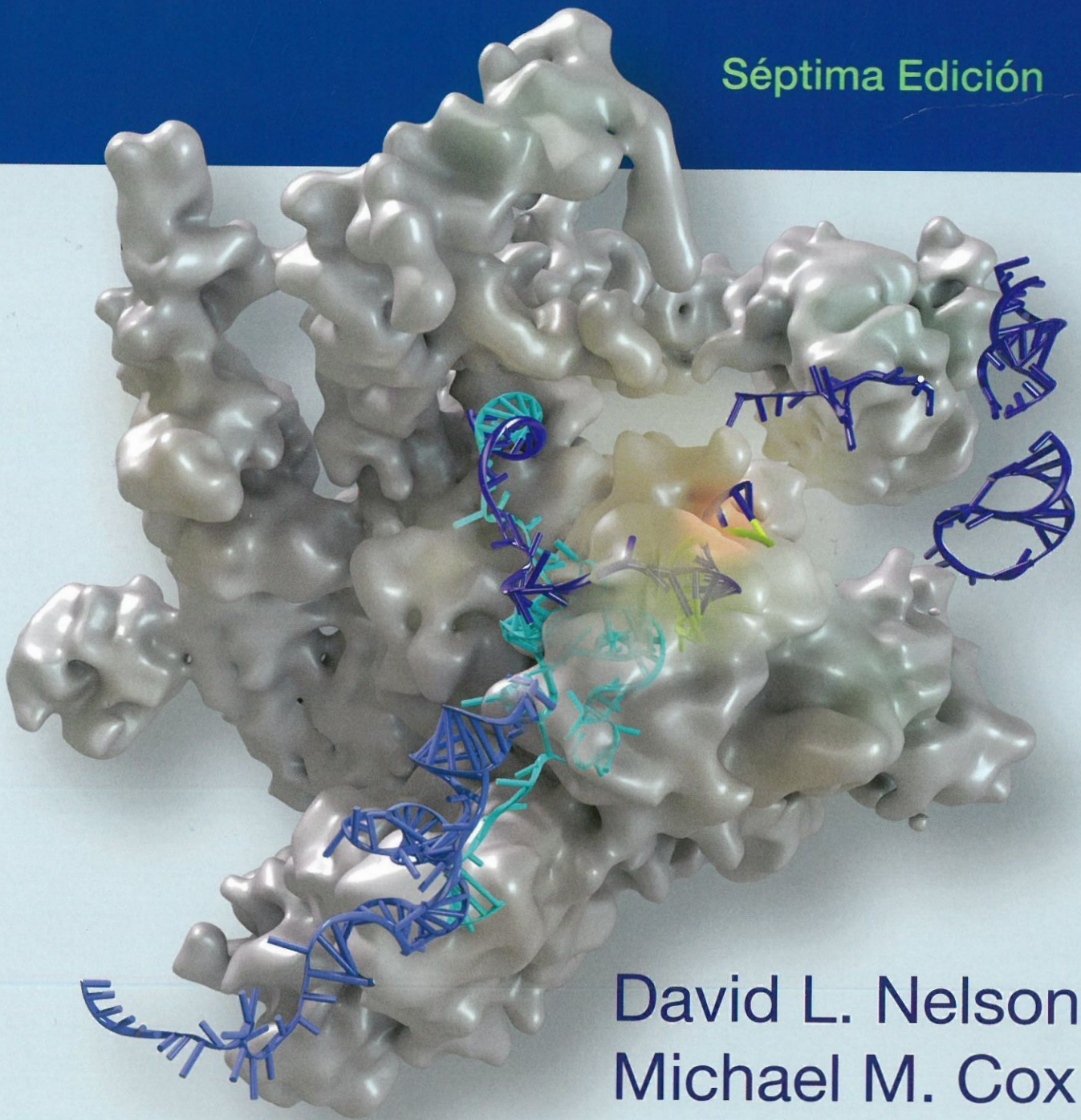
Lehninger

PRINCIPIOS de BIOQUÍMICA

Séptima Edición



David L. Nelson
Michael M. Cox



Lehninger
Principios de Bioquímica

SÉPTIMA EDICIÓN

OMEGA

Nota sobre la naturaleza de la ciencia

En este siglo XXI, una educación científica típica deja a menudo sin manifestar las bases filosóficas de la ciencia o confía en definiciones muy simplificadas. Dado que contempla realizar una carrera científica puede serle útil considerar una vez más los términos **ciencia, científico** y **método científico**.

La **ciencia** es tanto una forma de pensar sobre el mundo natural como la suma de la información y la teoría resultantes de tal manera de pensar. El poder y el éxito de la ciencia fluyen directamente de su dependencia de las ideas que se pueden comprobar: información sobre los fenómenos naturales que se pueden observar, medir y reproducir y teorías que tienen un valor predictivo. El progreso de la ciencia se asienta en un supuesto fundacional que, a menudo, no está explicitado pero que es crucial para la empresa: que las leyes que gobiernan las fuerzas y fenómenos del universo no están sujetas a cambio. El premio Nobel Jacques Monod se refirió a este supuesto básico como el "postulado de la objetividad". Se puede comprender, por tanto, el mundo natural al aplicar un proceso de investigación: el método científico. La ciencia no tendría éxito en un universo que nos hiciese trampas. Aparte del postulado de la objetividad, la ciencia no hace suposiciones inviolables acerca del mundo natural. Una idea científica útil es la que (1) ha sido o se puede sustanciar de manera repetida, (2) se puede utilizar para predecir con precisión nuevos fenómenos y (3) se centra en el mundo natural o el universo.

Las ideas científicas adoptan muchas formas. Los términos utilizados por los científicos para describir estas formas tienen significados muy diferentes de los utilizados por los no científicos. Una *hipótesis* es una idea o presunción que proporciona una explicación razonable y comprobable para una o más observaciones, pero puede carecer de una verificación experimental extensa. Una *teoría científica* es mucho más que una intuición. Es una idea que se ha verificado en cierta medida y que proporciona una explicación para un conjunto de observaciones experimentales. Una teoría se puede comprobar y puede servir de base de nuevos avances e innovaciones. Cuando una teoría científica se ha comprobado de manera repetida y validada en muchos frentes puede ser aceptada como un hecho.

En un sentido importante, lo que constituye la ciencia o una idea científica viene definido por el hecho de haberse publicado o no en la literatura científica después de una evaluación por pares, es decir, otros científicos activos. Hacia finales de 2014, alrededor de 34.500 revistas científicas en todo el mundo, revisadas por expertos, publican alrededor de 2,5 millones de artículos cada año, una rica cosecha de información que es propiedad, desde el nacimiento, de todo ser humano.

Los **científicos** son personas que aplican de manera rigurosa el método científico para entender el mundo natural. El solo hecho de poseer un título superior en una disciplina científica no hace a uno científico, ni la falta de tal título impide que uno pueda hacer contribuciones científicas importantes. Un científico ha de estar dispuesto a poner en duda cualquier idea cuando lo piden nuevos descubrimientos. Las ideas aceptadas por un científico han de basarse en observaciones medibles y reproducibles y el científico ha de exponer estas observaciones con total honestidad.

El **método científico** es una colección de caminos que llevan, todos ellos, al descubrimiento científico. El científico plantea una hipótesis y la somete a la prueba experimental. Gran parte de los procesos con los que trabajan los bioquímicos se descubrieron así. La estructura del DNA deducida por James Watson y Francis Crick condujo a la hipótesis de que el apareamiento de bases es el fundamento de la transferencia de información en la síntesis de polinucleótidos. Esta hipótesis ayudó a inspirar el descubrimiento de las DNA y RNA polimerasas.

Watson y Crick produjeron su estructura del DNA a través de un proceso de *construcción de modelos y cálculos*. No había experimentos reales, aunque para los cálculos y la construcción de modelos utilizaron datos obtenidos por otros científicos. Muchos científicos aventureros han aplicado el proceso de *exploración y observación* como vía para el descubrimiento. Viajes históricos de descubrimientos (viaje de Charles Darwin de 1831 en el H.M.S. *Beagle* entre ellos) ayudaron a cartografiar el planeta, catalogar sus habitantes y cambiar nuestra visión del mundo. Los científicos modernos siguen un camino similar cuando exploran las profundidades oceánicas o lanzan sondas a otros planetas. Un análogo de la hipótesis y experimento es la *hipótesis y deducción*. Crick razonó que ha de existir una molécula adaptadora que facilite la traducción de la información del RNA mensajero en proteína. Esta hipótesis llevó al descubrimiento del RNA de transferencia por Mahlon Hoagland y Paul Zamenick.

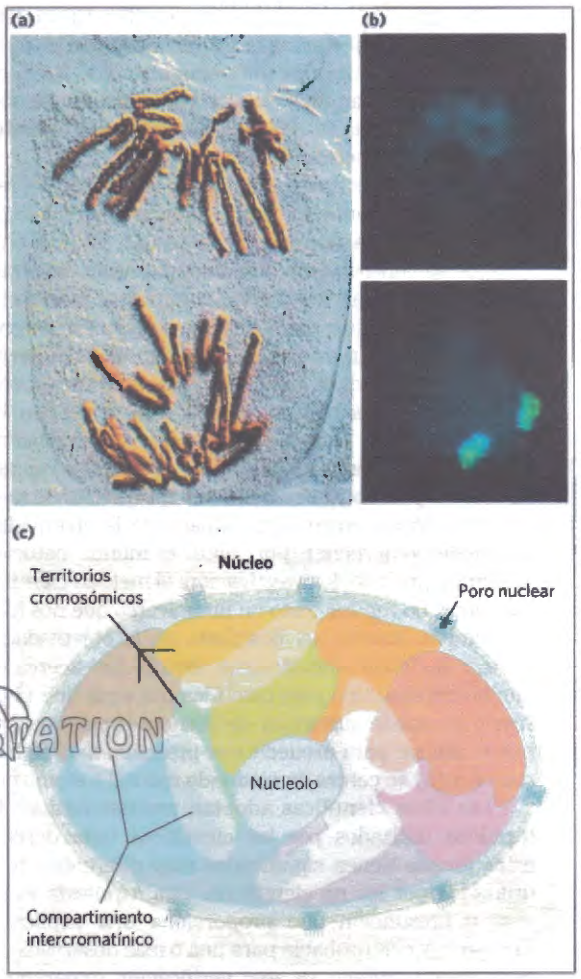
Pero, además, la *casualidad* juega, a menudo, un papel. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 y de los catalizadores RNA por Thomas Cech a principios de la década de 1980, fueron descubrimientos por azar, si bien eran científicos bien preparados. La *inspiración* también puede llevar a avances importantes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hoy una parte central de la biotecnología, fue desarrollada por Kary Mullis tras un destello de inspiración durante un viaje por carretera en el norte de California en 1983.

Estas rutas distintas para el descubrimiento científico pueden parecer muy diferentes pero tienen varias cosas en común. Se centran en el mundo natural. Confían en la *observación reproducible* y/o el *experimento*. Todas las ideas, conocimientos y hechos experimentales que surgen de estos esfuerzos se pueden comprobar y reproducir por científicos de cualquier parte del mundo. Todas pueden ser utilizadas por otros científicos para construir nuevas hipótesis y realizar nuevos descubrimientos. Todas conducen a información que se incluye adecuadamente en el campo de la ciencia. Conocer nuestro universo requiere trabajo duro pero no hay esfuerzo humano más interesante y potencialmente gratificante que probar y, en ocasiones conseguir, entender alguna parte del mundo natural.

Prólogo

Con la aparición de tecnologías cada vez más potentes que proporcionan visiones de procesos moleculares a nivel celular y de organismo, el progreso en bioquímica continúa rápidamente, proporcionando nuevas maravillas y nuevos retos. La imagen de nuestra cubierta muestra un espliceosoma, una de las máquinas moleculares de mayor tamaño en una célula eucariótica, que solo ahora ha sido posible someter a análisis estructurales modernos. Es un ejemplo de nuestro conocimiento actual de la vida a nivel estructural molecular. La imagen es una instantánea a partir de un conjunto complejo de reacciones, con una mejor focalización que no se había logrado nunca. Pero en la célula, solo es uno de los múltiples pasos conectados espacial y temporalmente a muchos otros procesos complejos que permanecen sin resolver y que, finalmente, podrían aparecer en ediciones futuras. Nuestro objetivo en esta séptima edición de *Principios de Bioquímica de Lehninger*, es, como siempre, conseguir un equilibrio: incluir nuevos y atractivos descubrimientos de investigación sin que el libro se haga pesado para los estudiantes. El criterio primordial para la inclusión de un avance es que el nuevo descubrimiento ayude a ilustrar un *principio de bioquímica* importante.

Con cada revisión de este libro de texto, hemos intentado mantener las cualidades que hicieron del texto original de Lehninger un clásico: escritura clara, explicaciones cuidadosas de conceptos difíciles y comunicación a los estudiantes sobre la forma en la que la bioquímica es entendida y practicada en la actualidad. Hemos escrito conjuntamente este texto y enseñado juntos la bioquímica general durante tres décadas. Nuestros miles de estudiantes en la Universidad de Wisconsin-Madison durante estos años han sido una fuente inagotable de ideas sobre cómo presentar la bioquímica con mayor claridad; nos han ilustrado e inspirado. Esperamos que esta séptima edición de *Lehninger* también ilustrará e inspirará a los actuales estudiantes de bioquímica de todas partes y quizás lleve algunos a amar la bioquímica tal como la amamos nosotros.



Photos: (a) Pr. G. Giménez-Martín/Science Source. (b) Karen Meaburn and Tom Misteli/National Cancer Institute.

Organización cromosómica en el núcleo eucariótico

NUEVO Ciencia de vanguardia

Entre los temas nuevos y puestos al día en esta edición se cuentan:

- Células sintéticas y genómica de enfermedades (Capítulo 1)
- Segmentos proteicos intrínsecamente desordenados (Capítulo 4) y su importancia en señalización (Capítulo 12)
- Cinética enzimática del estado pre-estacionario (Capítulo 6)
- Anotación génica (Capítulo 9)
- Edición de genes con CRISPR (Capítulo 9)
- Tráfico y dinámica en membranas (Capítulo 11)
- Funciones adicionales del NADH (Capítulo 13)
- Complejo de la celulosa sintasa (Capítulo 20)
- Mediadores especializados pro-resolución (Capítulo 21)
- Hormonas peptídicas; incretinas y glucosa sanguínea; irisina y ejercicio (Capítulo 23)
- Territorios cromosómicos (Capítulo 24)
- Nuevos detalles sobre la replicación del DNA eucariótico (Capítulo 25)
- Rotura del casquete; estructura del espliceosoma (Capítulo 26)

- Rescate de ribosomas; puesta al día en edición del RNA (Capítulo 27)
- Nuevas funciones de los RNA no codificantes (Capítulos 26, 28)
- Motivo de reconocimiento de RNA (Capítulo 28)

NUEVO Herramientas y tecnología

Las herramientas emergentes de la bioilogía de sistemas continúan transformando nuestro conocimiento de la bioquímica. Entre ellas se incluyen nuevos métodos de laboratorio y grandes bases de datos públicas, que son actualmente indispensables para los investigadores. Nuevas en esta edición de *Lehninger Principios de Bioquímica*

- Los métodos de secuenciación de DNA de nueva generación incluyen ahora las plataformas de secuenciación por ion semiconductor (Ion Torrent) y secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT). La discusión del texto sigue ahora la descripción de la secuenciación clásica de Sanger (Capítulo 8)
- La edición génica por CRISPR es una de las muchas actualizaciones en la discusión de la genómica (Capítulo 8)
- La base de datos LIPID MAPS y el sistema de clasificación de lípidos se incluyen en la discusión sobre lipidómica (Capítulo 10)

COPY-STATION

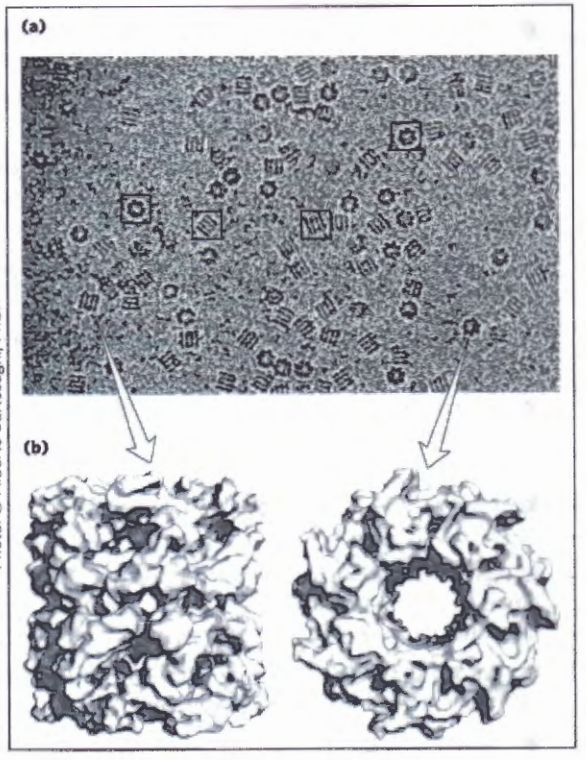


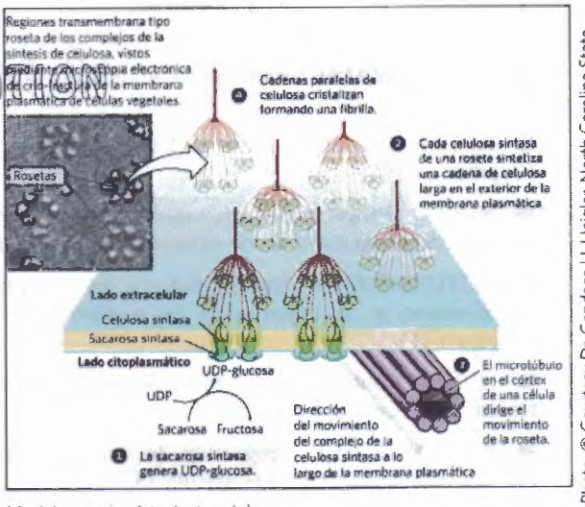
Photo: © Alberto Bartesaghi, PhD.

Estructura de la proteína chaperona GroEL determinada por crio-microscopia electrónica

- Se describe la crio-microscopia electrónica (Capítulo 19)
- El perfil ribosómico para determinar qué genes se traducen en un momento determinado, y muchas tecnologías relacionadas, se incluyen para ilustrar la versatilidad y potencia de la secuenciación de DNA (Capítulo 27)
- Fuentes de datos por internet tales como NCBI, PDB, SCOP2, KEGG y BLAST, mencionadas en el texto, (Capítulo 27), se muestran en la literatura com referencia de fácil acceso

NUEVO Consolidación del metabolismo vegetal

Todo el metabolismo de plantas está ahora consolidado en un solo capítulo, Capítulo 20, separado de la fosforilación oxidativa, en el Capítulo 19. El Capítulo 20 incluye la síntesis de ATP impulsada por la luz, la fijación del carbono, la fotorrespiración, el ciclo del glioxilato, la síntesis de almidón y celulosa y los mecanismos reguladores que aseguran la integración de todas estas actividades en el conjunto de la planta.

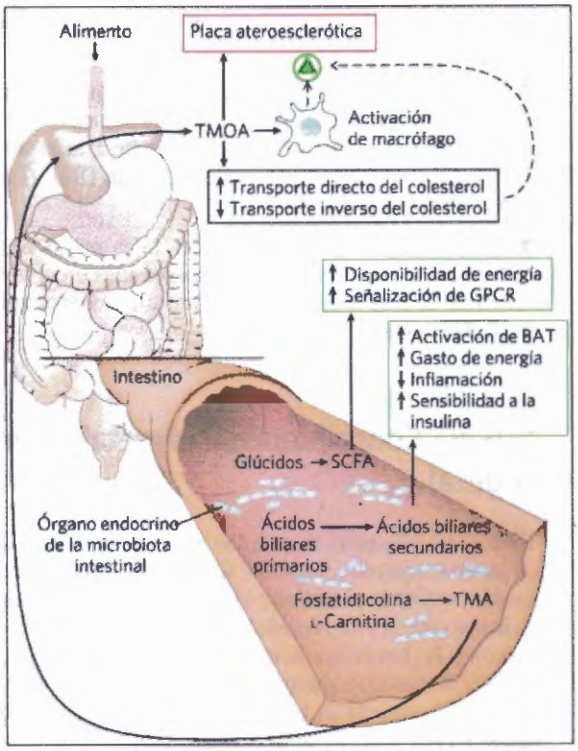


Modelo para la síntesis de celulosa

Photo: © Courtesy Dr. Candace H. Haigler, North Carolina State University and Dr. Mark Grimson, Texas Tech University.

NUEVO Conocimientos y aplicaciones médicas

Este icono se utiliza a lo largo de todo el libro para indicar material de interés médico especial. Como profesores, nuestro objetivo es que los estudiantes aprendan bioquímica y entiendan su importancia para una vida y un planeta más sanos. Muchas secciones exploran lo que sabemos acerca de los mecanismos moleculares de la enfermedad. Algunas de las aplicaciones médicas nuevas o actualizadas de esta edición son:



Efectos del metabolismo microbiano intestinal sobre la salud

- **ACTUALIZADO** Lactasa e intolerancia a la lactosa (Capítulo 7)
- **NUEVO** Síndrome de Guillain-Barré y gangliósidos (Capítulo 10)
- **NUEVO** Proyecto del arroz dorado para prevenir enfermedades por carencia de vitamina A (Capítulo 10)
- **ACTUALIZADO** Transportadores de resistencia multifármaco y su importancia en medicina clínica (Capítulo 11)
- **NUEVO** Conocimientos sobre la fibrosis cística y su tratamiento (Capítulo 11)
- **ACTUALIZADO** Progresión de múltiples pasos hacia el cáncer colorrectal (Capítulo 12)
- **NUEVO** Cribado de acil-carnitina en recién nacidos para el diagnóstico de enfermedad mitocondrial (Capítulo 17)
- **NUEVO** Enfermedades mitocondriales, donación mitocondrial e "hijos de tres padres" (Capítulo 19)
- **ACTUALIZADO** Metabolismo del colesterol, formación de placas y aterosclerosis (Capítulo 21)
- **ACTUALIZADO** Enzimas citocromo P-450 e interacciones entre fármacos (Capítulo 21)
- **ACTUALIZADO** Toxicidad del amoníaco en el cerebro (Capítulo 22)
- **NUEVO** Xenobióticos como disruptores endocrinos (Capítulo 23)

Tema especial: Integración del metabolismo, obesidad y la diabetes

La obesidad y sus consecuencias médicas, entre ellas enfermedades cardiovasculares y diabetes, se está convirtiendo rápidamente en una epidemia en el mundo industrializado, por lo que a lo largo de esta edición se incluye nuevo material sobre las conexiones bioquímicas entre obesidad y salud. Centrarnos en la diabetes proporciona un tema integrador a lo largo de los capítulos sobre el metabolismo y su control. Algunos de los temas que destacan la interrelación de metabolismo, obesidad y diabetes son:

- Acidosis en diabetes no tratada (Capítulo 2)
- Plegamiento defectuoso de proteínas, deposición de amiloide en el páncreas y diabetes (Capítulo 4)
- **ACTUALIZADO** Glucosa sanguínea y hemoglobina glucada en el diagnóstico y en el tratamiento de la diabetes (Recuadro 7-1)
- Productos finales de la glucación avanzada (AGE); su papel en la patología de la diabetes avanzada (Recuadro 7-1)
- Transporte defectuoso de glucosa y agua en dos formas de diabetes (Recuadro 11-1)
- **NUEVO** Transportador Na^+-glucosa y utilización de gliflozinas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Capítulo 11)
- Deficiencia en la captación de glucosa en la diabetes tipo 1 (Capítulo 14)
- MODY: una forma rara de diabetes (Recuadro 15-3)
- Los cuerpos cetónicos se producen en exceso en la diabetes y en la inanición (Capítulo 17)
- **NUEVO** Degradación de aminoácidos: el metilglioxal contribuye a la diabetes tipo 2 (Capítulo 18)
- Una forma rara de diabetes es resultado de defectos en las mitocondrias de las células β del páncreas (Capítulo 19)
- Gliceroneogénesis estimulada por tiazolidinadionas en la diabetes tipo 2 (Capítulo 21)
- Papel de la insulina para contrarrestar la glucosa sanguínea elevada (Capítulo 23)
- Secreción de insulina por células β pancreáticas en respuesta a cambios en la glucosa sanguínea (Capítulo 23)
- Cómo se descubrió y purificó la insulina (Recuadro 23-1)
- **NUEVO** Proteína quinasa activada por AMP en el hipotálamo e integración de señales hormonales del intestino, músculo y tejidos adiposos (Capítulo 23)
- **ACTUALIZADO** Papel de mTORC1 en la regulación del crecimiento celular (Capítulo 23)
- **NUEVO** Adiposo marrón y beige como tejidos termogénicos (Capítulo 23)

Copy-station

■ **NUEVO** Ejercicio, estimulación de la liberación de irisina y pérdida de peso (Capítulo 23)

■ **NUEVO** Comportamiento alimentario a corto plazo influido por grelina, PYY_{3-36} y cannabinoides (Capítulo 23)

■ **NUEVO** Papel de simbiontes microbianos en el intestino que influyen en el metabolismo energético y en la adipogénesis (Capítulo 23)

■ Insensibilidad tisular a la insulina en la diabets tipo 2 (Capítulo 23)

■ **ACTUALIZADO** Tratamiento de la diabetes tipo 2 con dieta, ejercicio, medicación y cirugía (Capítulo 23)

Tema especial: Evolución

Cada vez que un bioquímico estudia una ruta de desarrollo en nemátodos, identifica partes clave del sitio activo de un enzima al determinar qué partes están conservadas entre las especies, o busca el gen que está en la base de una enfermedad genética, lo hace confiando en la teoría evolutiva. Las agencias de financiación de la investigación apoyan el trabajo en nemátodos porque saben que los nuevos conocimientos serán de importancia para los humanos. La conservación de residuos funcionales en el sitio activo de un enzima nos indica la historia compartida de todos los organismos del planeta. Más a menudo que no, la búsqueda de un gen responsable de una enfermedad es un refinado ejercicio de filogenética. La evolución es, de este modo, un concepto básico para nuestra disciplina. Algunas de las muchas áreas que contempla la bioquímica desde un punto de vista evolutivo son

■ Cambios en las instrucciones hereditarias que permiten la evolución (Capítulo 1)

■ Orígenes de biomoléculas en la evolución química (Capítulo 1)

■ RNA o precursores de RNA como primeros genes y catalizadores (Capítulos 1, 26)

■ Cronología de la evolución biológica (Capítulo 1)

■ Utilización de combustibles inorgánicos por las primeras células (Capítulo 1)

■ Evolución de los eucariotas a partir de células más sencillas (teoría endosimbiótica) (Capítulos 1, 19, 20)

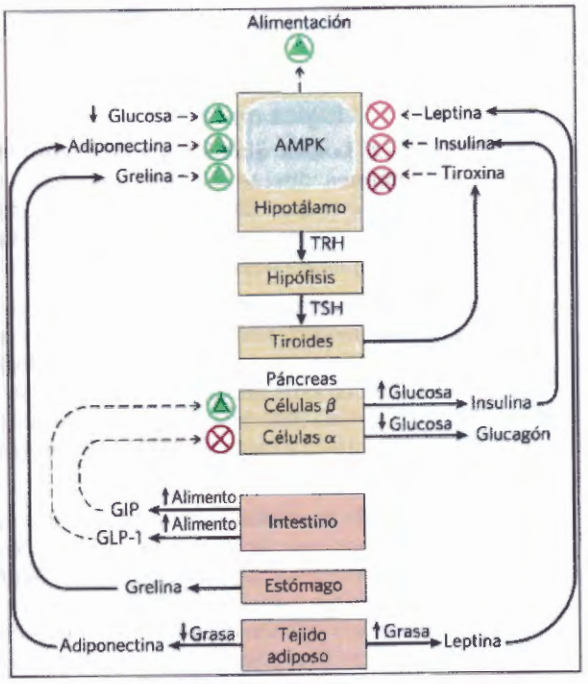
■ Secuencias de proteínas y árboles evolutivos (Capítulo 3)

■ Papel de la teoría de la evolución en las comparaciones de estructuras de proteínas (Capítulo 4)

■ Evolución de la resistencia a los antibióticos en las bacterias (Capítulo 6)

■ Explicación evolutiva por la que los nucleótidos de adenina son componentes de muchos coenzimas (Capítulo 8)

■ Genómica comparativa y evolución humana (Capítulo 9)



Regulación del comportamiento alimentario

■ Utilización de la genómica para conocer los ancestros de los neandertales (Recuadro 9-3)

■ Relaciones evolutivas entre ATPasas tipo V y tipo F (Capítulo 11)

■ Características universales de los sistemas GPCR (Capítulo 12)

■ Divergencia evolutiva de los enzimas de la β-oxidación (Capítulo 17)

■ Evolución de la fotosíntesis oxigénica (Capítulo 20)

■ **NUEVO** Presencia de orgánulos, núcleos incluidos, en bacterias planctomices (Recuadro 22-1)

■ Papel de los transposones en la evolución del sistema inmune (Capítulo 25)

■ Origen evolutivo común de transposones, retrovirus e intrones (Capítulo 26)

■ Discusión consolidada sobre la hipótesis del mundo RNA (Capítulo 26)

Símbolos de calidad de la enseñanza del *Lehninger*

Los estudiantes que entran por primera vez en contacto con la bioquímica a menudo tienen dificultades con dos aspectos clave del curso: enfrentarse con los problemas cuantitativos y utilizar lo que han aprendido en química orgánica para que les ayude a comprender la bioquímica. Esos mismos estudiantes también han de aprender un lenguaje complejo, con convenciones que, a menudo, pasan sin mencionarse explícitamente. Para ayudar a los estudiantes a salir adelante con todos

estos retos proporcionamos las siguientes ayudas para el estudio:

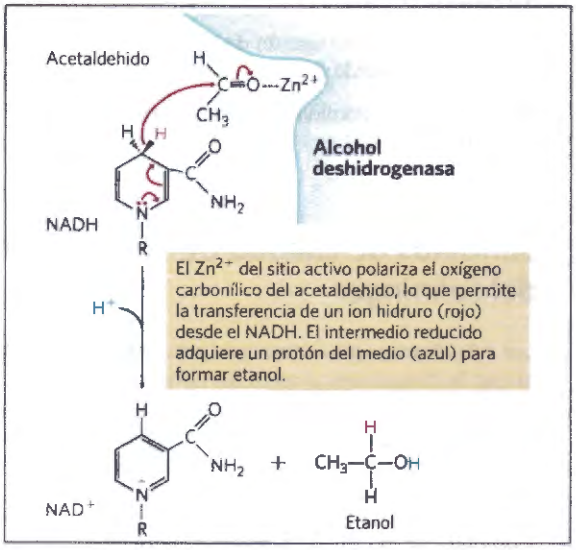
Interés sobre la lógica química

■ Sección 13.2, **Lógica química y reacciones bioquímicas comunes** discute los tipos de reacciones bioquímicas comunes que constituyen la base de todas las reacciones metabólicas lo que ayuda a los estudiantes a conectar la química orgánica con la bioquímica.

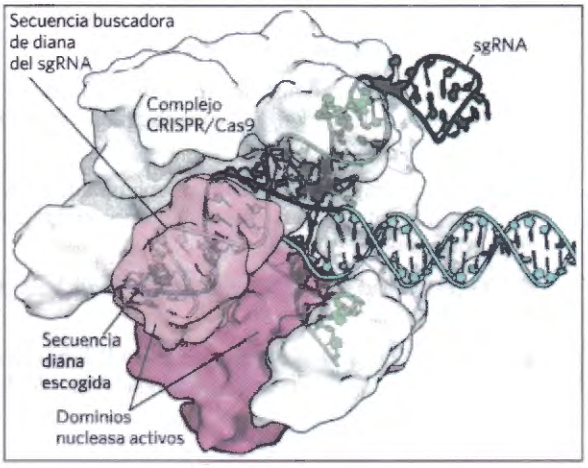
■ **Figuras de lógica química** ponen de relieve la conservación de mecanismos e ilustran patrones que facilitan el aprendizaje de las rutas. Las figuras de lógica química aparecen en cada una de las rutas metabólicas centrales, entre ellas glucólisis (Fig. 14-3), ciclo del ácido cítrico (Fig. 16-7) y oxidación de los ácidos grasos (Fig. 17-9).

■ Las **figuras de mecanismos** constituyen descripciones paso a paso que ayudan a los estudiantes a comprender los procesos de reacción. Estas figuras utilizan de manera consistente un conjunto de convenciones introducido y explicado en detalle en el primer mecanismo enzimático encontrado (quimotripsina, Fig. 6-23).

■ **Bibliografía adicional** Los estudiantes e instructores pueden encontrar más material acerca de los temas del texto en la lista de Bibliografía adicional de cada capítulo, a las que se puede acceder en www.macmillanlearning.com/lehningerBiochemistry7e así como a través de la plataforma Sapling Plus para Lehninger. Cada lista cita revisiones accesibles, artículos clásicos y artículos de investigación que ayudarán a los usuarios a profundizar tanto en la historia como en la situación actual de la bioquímica.



Mecanismo de reacción de la alcohol deshidrogenasa



estructura CRISPR/Cas9

Figuras claras

■ **Representaciones más pulcras de las figuras clásicas** son más fáciles de interpretar y aprender.

■ **Estructuras moleculares** generadas específicamente para este libro, utilizan formas y esquemas de color que son consitentes internamente.

■ Figuras **con pasos anotados y numerados** ayudan a explicar procesos complejos.

■ **Figuras resumen** ayudan al estudiante a mantener la gráfica general al tiempo que se aprenden los caracteres específicos.

Herramientas para resolver problemas

■ **Ejemplos prácticos dentro del texto** ayudan a los estudiantes a mejorar sus capacidades para resolver problemas cuantitativos, dirigiéndolos a través de las ecuaciones más difíciles.

■ **Más de 600 problemas de final de capítulo** dan a los estudiantes más oportunidades de practicar lo que han aprendido.

■ **Problemas de análisis de datos** (uno al final de cada capítulo) preparados por Brian White de la Universidad de Massachussetts-Boston, animan a los estudiantes a sintetizar lo que han aprendido y a aplicar sus conocimientos a la interpretación de datos de la bibliografía.

Convenciones clave

Muchas de las convenciones que son tan necesarias para comprender cada tema bioquímico así como la literatura bioquímica se separan del texto resaltándolas. Estas **Convenciones clave** incluyen expresiones claras de muchos supuestos y convenciones que se espera a menudo que los estudiantes asimilen sin que se las hayan mencionado (por ejemplo, las secuencias peptídicas se escriben desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal de izquierda a derecha; las secuencias de nucleótidos se escriben desde el extremo 5' al 3', de izquierda a derecha).

Índice general

Prólogo viii

1. Fundamentos de la Bioquímica 1

I ESTRUCTURA Y CATÁLISIS 45

2. El Agua 47
3. Aminoácidos, péptidos y proteínas 75
4. Estructura tridimensional de las proteínas 115
5. Función de las proteínas 157
6. Enzimas 189
7. Glúcidos y glucobiología 243
8. Nucleótidos y ácidos nucleicos 281
9. Tecnologías de la información basadas en el DNA 319
10. Lípidos 359
11. Membranas Biológicas y transporte 387
12. Bioseñalización 437

II BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO 491

13. Bioenergética y tipos de reacción bioquímicos 495
14. Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato 533
15. Principios de regulación metabólica 573
16. El ciclo del ácido cítrico 617
17. Catabolismo de los ácidos grasos 647
18. Oxidación de aminoácidos y producción de urea 673
19. Fosforilación oxidativa 707
20. Fotosíntesis y síntesis de glúcidos en plantas 751
21. Biosíntesis de lípidos 805
22. Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas 853
23. Regulación hormonal e integración del metabolismo de los mamíferos 899

III LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN 949

24. Genes y cromosomas 951
25. Metabolismo del DNA 979
26. Metabolismo del RNA 1027
27. Metabolismo de las proteínas 1069
28. Regulación de la expresión génica 1119

Soluciones abreviadas de los Problemas

Glosario

Índice I-1

Índice de materias

Fundamentos de la Bioquímica 1

1.1 Fundamentos celulares 3

Las células son las unidades estructurales y funcionales de todos los organismos vivos 3
Las dimensiones celulares están limitadas por la capacidad de difusión 3
Los organismos pertenecen a tres distintos dominios de la vida 4
Los organismos difieren mucho respecto a fuentes de energía y precursores biosintéticos 5
Bacterias y Arqueas comparten muchas características, pero difieren en muchos aspectos importantes 6
Las células eucarióticas poseen diversos orgánulos membranosos que pueden aislarse para su estudio 7
El citoplasma se organiza gracias al citoesqueleto y es altamente dinámico 7
Las células construyen estructuras supramoleculares 9
Los estudios in vitro podrían no detectar interacciones importantes entre moléculas 10

1.2 Fundamentos químicos 12

Las biomoléculas son compuestos de carbono con diversos grupos funcionales 12
Las células contienen un conjunto universal de moléculas pequeñas 13
RECUADRO 1-1 **Peso molecular, masa molecular y las unidades que deben utilizarse 13**
Las macromoléculas son los principales constituyentes de las células 15
La estructura tridimensional se describe en términos de configuración y conformación 16
RECUADRO 1-2 **Louis Pasteur y la actividad óptica: *In vino, veritas* 18**
Las interacciones entre las biomoléculas son estereoespecíficas 19

1.3 Fundamentos físicos 20

Los organismos vivos existen en un estado estacionario dinámico y no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno 21
Los organismos transforman energía y materia de su entorno 21
El flujo de electrones proporciona energía para los organismos 21
RECUADRO 1-3 **Entropía: las cosas se desmoronan 22**
Crear y mantener el orden requiere trabajo y energía 22
El acoplamiento energético conecta las reacciones biológicas 24
K_{eq} y ΔG° miden la tendencia de una reacción a transcurrir espontáneamente 25
Los enzimas facilitan secuencias de reacciones químicas 28
El metabolismo está regulado para conseguir equilibrio y economía 29

1.4 Fundamentos genéticos 30

La continuidad genética reside en las moléculas de DNA 30

COPY-STATION

La estructura del DNA hace posible su replicación y reparación con fidelidad casi perfecta 31
La secuencia lineal del DNA codifica proteínas con estructuras tridimensionales 31

1.5 Fundamentos evolutivos 32
Los cambios en las instrucciones hereditarias hacen posible la evolución 32
Las primeras biomoléculas aparecieron por evolución química 33
Los primeros genes y catalizadores podrían haber sido moléculas de RNA o precursores relacionados 34
La evolución biológica empezó hace más de tres mil quinientos millones de años 35
La primera célula utilizó probablemente combustibles inorgánicos 35
Las células eucarióticas evolucionaron a partir de precursores más simples a través de diversas fases 36
La anatomía molecular revela relaciones evolutivas 37
La genómica funcional permite asignar genes a procesos celulares específicos 39
Las comparaciones genómicas tienen una importancia cada vez mayor en la biología y medicina humanas 39

I ESTRUCTURA Y CATÁLISIS 45

El Agua 47

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos 47
Los enlaces de hidrógeno le confieren al agua sus propiedades extraordinarias 47
El agua forma enlaces de hidrógeno con los solutos polares 49
El agua interacciona electrostáticamente con los solutos cargados 50
La entropía aumenta cuando se disuelve una sustancia cristalina 51
Los gases apolares son poco solubles en agua 51
Los compuestos apolares fuerzan cambios energéticamente desfavorables en la estructura del agua 51
Las interacciones de van der Waals son atracciones interatómicas débiles 53
Las interacciones débiles son cruciales para la estructura y función de las macromoléculas 54
Los solutos afectan a las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas 55

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles 58
El agua pura está ligeramente ionizada 58
La ionización del agua se expresa mediante una constante de equilibrio 59
La escala de pH representa las concentraciones de H^+ y OH^- 60
Los ácidos y bases débiles tienen constantes de disociación características 61
Las curvas de titulación proporcionan el pK_a de los ácidos débiles 62

2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos 63
Los tampones son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas 63
La ecuación de Henderson-Hasselbalch relaciona pH, pK_a y concentración de tampón 64
Ácidos o bases débiles tamponan células y tejidos contra cambios de pH 65
La diabetes no tratada produce acidosis que puede ser mortal 67
RECUADRO 2-1 **MEDICINA Sobre cómo ser su propio conejillo de Indias (no lo intente en casa !)** 68

2.4 El agua como reactivo 69

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos 69

Aminoácidos, péptidos y proteínas 75

3.1 Aminoácidos 75
Los aminoácidos tienen características estructurales comunes 76
Los residuos aminoácidos de las proteínas son estereoisómeros L 78
Los aminoácidos se pueden clasificar según su grupo R 79
RECUADRO 3-1 **MÉTODOS Absorción de la luz por las moléculas: Ley de Lambert-Beer** 80
Los aminoácidos no estándar tienen también importantes funciones 81
Los aminoácidos pueden actuar como ácidos y como bases 81
Los aminoácidos tienen curvas de titulación características 81
La curva de titulación predice la carga eléctrica de los aminoácidos 84
Los aminoácidos difieren en sus propiedades ácido-base 84

3.2 Péptidos y proteínas 85
Los péptidos son cadenas de aminoácidos 85
Los péptidos pueden distinguirse por su comportamiento de ionización 86
Los péptidos y polipéptidos biológicamente activos se presentan en una gran variedad de composición y tamaño 86
Algunas proteínas contienen grupos químicos diferentes a los aminoácidos 88

3.3 Trabajar con proteínas 88
Las proteínas se pueden separar y purificar 89
Las proteínas pueden separarse y caracterizarse por electroforesis 92
Es posible cuantificar proteínas no aisladas 94

3.4 Estructura de proteínas: estructura primaria 96
La función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos 96
Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de millones de proteínas 97
La química de proteínas se enriquece con métodos derivados de la secuenciación clásica de polipéptidos 97
La espectrometría de masas es un método alternativo para determinar secuencias de aminoácidos 100
Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas 102
La secuencia de aminoácidos proporciona información bioquímica importante 103
Las secuencias de proteínas permiten deducir la historia de la vida en la Tierra 104

COPY-STATION

RECUADRO 3-2 Secuencias consenso y logotipos de secuencia 105

Estructura tridimensional de las proteínas 115

4.1 Visión general de la estructura de las proteínas 116
La conformación de una proteína está estabilizada principalmente por interacciones débiles 116
El enlace peptídico es plano y rígido 118

4.2 Estructura secundaria de las proteínas 120
La hélice α es una estructura secundaria habitual en proteínas 120
RECUADRO 4-1 METODOS Cómo distinguir la mano derecha de la izquierda 121
La secuencia de aminoácidos afecta a la estabilidad de la hélice α 122
La conformación β organiza las cadenas polipeptídicas en forma de hoja 123
Los giros β son frecuentes en las proteínas 123
Las estructuras secundarias comunes tienen ángulos diedros característicos 124
Las estructuras secundarias comunes pueden evaluarse mediante dicroísmo circular 125

4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas 125
Las proteínas fibrosas están adaptadas a una función estructural 126
RECUADRO 4-2 La ondulación permanente es un ejemplo de ingeniería bioquímica 127
RECUADRO 4-3 MEDICINA Razones por las que marinos, exploradores y estudiantes universitarios deben consumir fruta y verduras frescas 128
En las proteínas globulares la diversidad estructural refleja la diversidad funcional 131
La mioglobina proporcionó las primeras claves acerca de la complejidad de las estructuras proteicas globulares 131
RECUADRO 4-4 El banco de datos de estructura de proteínas (Protein Data Bank, PDB) 132
Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias diversas 133
RECUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína 134
Algunas proteínas o segmentos de proteína están intrínsecamente desordenados 138
Los motivos proteicos constituyen la base de la clasificación estructural de las proteínas 140
Las estructuras cuaternarias de las proteínas comprenden desde dímeros sencillos hasta grandes complejos 141

4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas 142
La pérdida de la estructura proteica conduce a la pérdida de función 143
La secuencia de aminoácidos determina la estructura terciaria 144
Los polipéptidos se pliegan rápidamente según un proceso en varias etapas 145
Algunas proteínas experimentan un plegamiento asistido 146
Defectos en el plegamiento de proteínas constituyen la base molecular de una amplia gama de enfermedades genéticas humanas 147
RECUADRO 4-6 MEDICINA Muerte por plegamiento incorrecto: las enfermedades priónicas 150

Función de las proteínas 157

5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno 158
El oxígeno puede unirse a un grupo prostético hemo 158
Las globinas son una familia de proteínas de unión de oxígeno 159
La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno 159
Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente 160
La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando 162
El oxígeno es transportado en la sangre por la hemoglobina 163
Las subunidades de la hemoglobina son estructuralmente similares a la mioglobina 163
La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno 164
La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa 165
La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente 166
RECUADRO 5-1 MEDICINA Monóxido de carbono: un asesino silencioso 168
Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa 168
La hemoglobina también transporta H^+ y CO_2 170
La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato 171
La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina 172

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos. El sistema inmune y las inmunoglobulinas 174
La respuesta inmune incluye un conjunto de células y proteínas especializadas 174
Los anticuerpos poseen dos lugares idénticos de unión a antígeno 176
Los anticuerpos se unen fuertemente y de manera específica al antígeno 177
Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes 178

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares 179
Las principales proteínas del músculo son la miosina y la actina 179
Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso para dar estructuras ordenadas 182
Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina 183

Enzimas 189

6.1 Introducción a los enzimas 189
La mayoría de enzimas son proteínas 190
Los enzimas se clasifican según la reacción catalizada 191

6.2 Funcionamiento de los enzimas 192
Los enzimas alteran las velocidades de reacción pero no los equilibrios 192
Las velocidades de reacción y los equilibrios tienen definiciones termodinámicas precisas 194

COPY-STATION

Unos pocos principios explican el poder catalítico y la especificidad de los enzimas 195
Las interacciones débiles entre enzima y sustrato son óptimas en el estado de transición 196
La energía de fijación contribuye a la especificidad de reacción y a la catálisis 197
Grupos catalíticos específicos contribuyen a la catálisis 199

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo 200
La concentración de sustrato afecta a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas 201
La relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción enzimática se puede expresar de manera cuantitativa 202
Los parámetros cinéticos se utilizan para comparar actividades enzimáticas 203
RECUADRO 6-1 **Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína 204**
Muchos enzimas catalizan reacciones en las que intervienen dos o más sustratos 206
La actividad enzimática depende del pH 208
La cinética del estado pre-estacionario puede aportar pruebas sobre pasos específicos de la reacción 208
Los enzimas están sujetos a inhibición reversible o irreversible 209
RECUADRO 6-2 **Pruebas cinéticas para determinar los mecanismos de inhibición 211**
RECUADRO 6-3 **MEDICINA Un caballo de Troya bioquímico para la curación de la enfermedad del sueño africana 213**

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas 215
El mecanismo de la quimotripsina implica acilación y desacilación de un residuo Ser 216
El conocimiento del mecanismo de las proteasas conduce a nuevos tratamientos para las infecciones con VIH 220
En la hexoquinasa se produce un encaje inducido durante la unión del sustrato 221
El mecanismo de reacción de la enolasa requiere la presencia de iones metálicos 222
La lisozima utiliza dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas 223
La comprensión de los mecanismos enzimáticos permiter obtener antibióticos útiles 225

6.5 Enzimas reguladores 227
Los enzimas alostéricos experimentan cambios de conformación en respuesta a la unión de moduladores 228
Las propiedades cinéticas de los enzimas alostéricos divergen del comportamiento de Michaelis-Menten 229
Algunos enzimas están regulados por modificación covalente reversible 230
Los grupos fosforilo afectan la estructura y la actividad catalítica de los enzimas 231
Las fosforilaciones múltiples permiten un control exquisito de la regulación 232
Algunos enzimas y otras proteínas son regulados mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático 232
Una cascada de zimógenos activados proteolíticamente conduce a la coagulación de la sangre 234
Algunos enzimas reguladores utilizan varios mecanismos de regulación 236

Glúcidos y glucobiología 243

7.1 Monosacáridos y disacáridos 243
Las dos familias de monosacáridos son las aldosas y las cetosas 244
Los monosacáridos tienen centros asimétricos 244
Los monosacáridos comunes tienen estructura cíclica 245
Los organismos contienen numerosos derivados de las hexosas 248
RECUADRO 7-1 **MEDICINA Determinación de la glucosa sanguínea en el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes 250**
Los monosacáridos son agentes reductores 251
Los disacáridos contienen un enlace glucosídico 252
RECUADRO 7-2 **El azúcar es dulce, pero.... algunas otras cosas también 254**

7.2 Polisacáridos 254
Algunos homopolisacáridos tienen función estructural 257
Los factores estéricos y los puentes de hidrógeno contribuyen al plegamiento de los homopolisacáridos 258
Las paredes celulares de algas y bacterias contienen heteropolisacáridos estructurales 259
Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos e la matriz extracelular 260

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucoesfingolípidos 263
Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular que contienen glucosaminoglucanos 263
RECUADRO 7-3 **MEDICINA Defectos en la síntesis o degradación de glucosaminoglucanos pueden producir enfermedades humanas graves 266**
Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente 267
Los glucolípidos y los lipopolisáridos son componentes de membrana 268

7.4 Los glúcidos son moléculas que contienen información: el código de los azúcares 269
Las lectinas son proteínas que leen el código de los azúcares y que intervienen en muchos procesos biológicos 270
Las interacciones lectina-glúcido son muy específicas y, a menudo, polivalentes 273

7.5 Trabajando con glúcidos 274

Nucleótidos y ácidos nucleicos 281

8.1 Algunos conceptos básicos 281
Los nucleótidos y los ácidos nucleicos contienen bases y pentosas características 281
Los nucleótidos sucesivos de los ácidos nucleicos están unidos por enlaces fosfodiéster 284
Las propiedades de las bases de los nucleótidos influyen en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos 286

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos 287
El DNA es una doble hélice que almacena información genética 287

COPY STATION

El DNA puede adoptar diferentes formas tridimensionales 290
Algunas secuencias de DNA adoptan estructuras no habituales 291
Los RNA mensajeros codifican las cadenas polipeptídicas 293
Muchos RNA tienen estructuras tridimensionales complejas 293

8.3 Química de los ácidos nucleicos 295
El DNA y el RNA de doble hélice se pueden desnaturalizar 295
Los nucleótidos y los ácidos nucleicos experimentan transformaciones no enzimáticas 298
Algunas bases del DNA están metiladas 300
La síntesis química de DNA ha sido automatizada 301
Las secuencias génicas pueden amplificarse con la reacción en cadena de la polimerasa 301
Se pueden determinar las secuencias de largas cadenas de DNA 303
Las técnicas de secuenciación de DNA avanzan con rapidez 305
RECUADRO 8-1 **Un arma poderosa en la medicina forense 306**

8.4 Otras funciones de los nucleótidos 311
Los nucleótidos transportan energía química en las células 311
Los nucleótidos de adenina forman parte de muchos cofactores enzimáticos 313
Algunos nucleótidos son moléculas reguladoras 313
Los nucleótidos de adenina también actúan de señal 313

Tecnologías de la información basadas en el DNA 319

9.1 Estudio de los genes y sus productos 320
Los genes pueden aislarse por clonación de DNA 320
El DNA recombinante se obtiene mediante endonucleasas de restricción y DNA ligasa 321
Los vectores de clonación permiten la amplificación de fragmentos de DNA insertados 324
La expresión de genes clonados puede producir grandes cantidades de proteína 327
Para expresar proteínas recombinantes se usan muchos sistemas diferentes 328
La alteración de los genes clonados produce proteínas modificadas 330
Las etiquetas terminales crean sitios de unión para la purificación por afinidad 331
La reacción en cadena de la polimerasa puede adaptarse para convertirse en un eficaz método de clonaje 333

9.2 Métodos basados en el DNA para estudiar la función de las proteínas 334
Las bibliotecas genómicas proporcionan catálogos especializados de información genética 334
Las relaciones entre las secuencias o las estructuras suministran información sobre la función de las proteínas 335
Las proteínas de fusión y la inmunofluorescencia pueden localizar proteínas en las células. 336
Las interacciones proteína-proteína pueden contribuir a determinar la función de las proteínas 338
Los microchips de DNA suministran información sobre los patrones de expresión de RNA y otros aspectos 340
La inactivación o la alteración de un gen por CRISPR pueden revelar su función 341

9.3 La genómica y la historia humana 343
La anotación proporciona una descripción del genoma 343
RECUADRO 9-1 **MEDICINA Medicina genómica personalizada 344**
El genoma humano contiene muchos tipos de secuencias 345
La secuenciación del genoma suministra información sobre aquello que nos hace humanos 347
Las comparaciones genómicas ayudan a localizar los genes implicados en enfermedades. 349
Las secuencias genómicas iluminan nuestro pasado y ofrecen oportunidades de futuro 351
RECUADRO 9-2 **MEDICINA Los parientes más próximos de la humanidad 353**

Lípidos 359

10.1 Lípidos de almacenamiento 359
Los ácidos grasos son derivados de hidrocarburos 359
Los triacilgliceroles son ésteres de ácidos grasos y glicerol 362
Los triacilgliceroles aportan energía almacenada aislamiento 362
La hidrogenación parcial de los aceites de cocina mejora su estabilidad pero produce ácidos grasos con efectos perjudiciales para la salud 363
Las ceras sirven como almacenes de energía y como cubiertas impermeables al agua 363

10.2 Lípidos estructurales de las membranas 364
Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico 365
Algunos glicerofosfolípidos tienen ácidos grasos unidos por enlace éter 366
Los cloroplastos contienen galactolípidos y sulfolípidos 367
Las arquebacterias contienen lípidos de membrana singulares 367
Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina 368
Los esfingolípidos de la superficie celular son sitios de reconocimiento biológico 369
Los fosfolípidos y los esfingolípidos se degradan en los lisosomas 370
Los esteroles tienen cuatro anillos hidrocarbonados fusionados 370
RECUADRO 10-1 **MEDICINA Acumulación anormal de lípidos de membrana: algunas enfermedades genéticas humanas 371**

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos 372
Los fosfatidilinositoles y algunos derivados de la esfingosina actúan como señales intracelulares 372
Los icosanoides son portadores de mensajes a las células vecinas 373
Las hormonas esteroides transportan mensajes entre tejidos 374
Las plantas vasculares producen millares de señales volátiles 375
Las vitaminas A y D son precursores hormonales 375

CORY-STATION

Las vitaminas E y K y las quinonas lipídicas son cofactores de oxidación-reducción 377
Los dolicoles activan precursores glucídicos para la biosíntesis 378
Muchos pigmentos naturales son dienos conjugados lipídicos 379
Los policétidos son productos naturales con actividades biológicas potentes 379

10.4 Trabajando con lípidos 380
La extracción de lípidos requiere la utilización de disolventes orgánicos 380
La cromatografía de adsorción separa los lípidos de polaridad diferente 380
La cromatografía de gases separa las mezclas de derivados lipídicos volátiles 381
La hidrólisis específica ayuda a determinar la estructura lipídica 381
La espectrometría de masas revela la estructura lipídica completa 382
La lipidómica pretende catalogar todos los lípidos y sus funciones 382

Membranas Biológicas y transporte 387

11.1 Composición y arquitectura de las membranas 388
Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica 388
Todas las membranas biológicas comparten ciertas propiedades fundamentales 389
El elemento básico estructural de las membranas es una bicapa lipídica 390
Tres tipos de proteínas de membrana difieren en la naturaleza de su asociación con la misma 391
Muchas proteínas integrales de membrana abarcan la bicapa lipídica 392
Regiones hidrofóbicas de proteínas integrales de membrana se asocian con lípidos de membrana 393
A partir de su secuencia puede predecirse a veces la topología de una proteína integral de membrana 394
Lípidos unidos covalentemente anclan algunas proteínas de membrana 395
Las proteínas anfitrópicas se asocian de manera reversible con la membrana 397

11.2 Dinámica de membranas 397
Los grupos acilo del interior de la bicapa están ordenados en grados diferentes 397
El movimiento de lípidos transbicapa requiere catálisis 398
Lípidos y proteínas difunden lateralmente en la bicapa 399
Los esfingolípidos y el colesterol se agrupan conjuntamente en balsas de membrana 401
La curvatura y la fusión de membranas son cruciales en muchos procesos biológicos 403
Ciertas proteínas integrales de la membrana plasmática favorecen la adhesión superficial, la señalización y otros procesos celulares 405

11.3 Transporte de solutos a través de membranas 405
El transporte puede ser activo o pasivo 406
Los transportadores y los canales iónicos comparten algunas propiedades estructurales pero tienen mecanismos diferentes 406
El transportador de glucosa de los eritrocitos facilita el transporte pasivo 408
El intercambiador de cloruro-bicarbonato cataliza el cotransporte electroneutro de aniones a través de la membrana plasmática 410
RECUADRO 11-1 **Transporte defectuoso de glucosa y de agua en dos formas de diabetes 411**
El transporte activo da lugar al movimiento de soluto contra un gradiente de concentración o un gradiente electroquímico 412
Las ATPasas tipo P experimentan fosforilación durante sus ciclos catalíticos 414
Las ATPasas tipo V y tipo F son bombas de protones impulsadas por el ATP 416
Los transportadores ABC utilizan ATP para impulsar el transporte activo de una amplia gama de sustratos 417
RECUADRO 11-2 **MEDICINA Un canal iónico defectuoso en la fibrosis quística 419**
Los gradientes de iones proporcionan la energía para el transporte activo secundario 418
Las acuaporinas forman canales transmembrana hidrofílicos para el paso de agua 423
Los canales selectivos de iones permiten el movimiento rápido de iones a través d e las membranas 425
La función del canal iónico se mide eléctricamente 426
La estructura de un canal de K^+ muestra las bases de su especificidad 426
Los canales iónicos de compuerta son básicos en la función neuronal 427
Canales iónicos defectuosos pueden tener consecuencias fisiológicas graves 430

Biosenalización 437

12.1 Características generales de la transducción de señales 437

12.2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros 440
El sistema receptor β-adrenérgico actúa a través del segundo mensajero cAMP 441
RECUADRO 12-1 **Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad 442**
Diversos mecanismos inducen la terminación de la respuesta del receptor β adrenérgico 446
El receptor β-adrenérgico se desensibiliza mediante fosforilación y por asociación con arrestina 448
El AMP cíclico actúa como segundo mensajero para muchas moléculas reguladoras 449
Diacilglicerol, inositol trisfosfato y Ca^{2+} tienen papeles relacionados como segundos mensajeros 450
El calcio es un segundo mensajero localizado en el espacio y en el tiempo 451
RECUADRO 12-2 **METODOS Bioquímica visualizada en una célula viva 452**

12.3 GPCR en la visión, el olfato y el gusto 456
El ojo de vertebrados utiliza mecanismos GPCR clásicos 456
RECUADRO 12-3 **MEDICINA Daltonismo: Experimento de John Dalton desde la tumba 458**
El olfato y el gusto en vertebrados utilizan mecanismos similares al sistema visual 458
Todos los sistemas GPCR comparten características universales 458

GORY STATION

12.4 Receptores tirosina quinasas 460
La estimulación del receptor de insulina inicia una cascada de reacciones de fosforilación de proteínas 460
El fosfolípido de membrana PIP^3 actúa en una rama de la señalización de la insulina 463
La comunicación cruzada entre sistemas de señalización es frecuente y compleja 464

12.5 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G 465

12.6 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana 467
Módulos proteicos unen residuos Tyr, Ser o Thr fosforilados de proteínas asociadas 467
Las balsas de membrana y las caveolas segregan proteínas de señalización 468

12.7 Canales iónicos de compuerta regulada 470
Los canales iónicos son el fundamento de la señalización eléctrica en células excitables 470
Los canales iónicos de compuerta regulada por voltaje producen potenciales de acción neuronales 471
Las neuronas tienen canales receptores que responden a diferentes neurotransmisores 472
Las toxinas apuntan a los canales iónicos 472

12.8 Regulación de la transcripción por receptores nucleares de hormonas 473

12.9 Señalización en microorganismos y plantas 474
La señalización bacteriana necesita la fosforilación en un sistema de dos componentes 474
Los sistemas de señalización en plantas tienen algunos de los componentes utilizados por microbios y mamíferos 474

12.10 Regulación del ciclo celular por proteína quinasas 475
El ciclo celular tiene cuatro fases 476
Los niveles de las proteína quinasas dependientes de ciclina experimentan oscilaciones 476
Las CDK regulan la división celular por fosforilación de proteínas clave 479

12.11 Oncogenes, genes supresores de tumores y muerte celular programada 480
Los oncogenes son formas mutadas de genes de proteínas que regulan el ciclo celular 480
Defectos en ciertos genes eliminan las restricciones normales sobre la división celular 481
RECUADRO 12-4 **MEDICINA Desarrollo de inhibidores de proteína quinasas para el tratamiento del cáncer 482**
La apoptosis es el suicidio celular programado 484

II BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO 491

Bioenergética y tipos de reacción bioquímicos 495

13.1 Bioenergética y termodinámica 496
Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica 496
Las células precisan fuentes de energía libre 497
La variación de energía libre estándar está directamente relacionada con la constante de equilibrio 497
El cambio de energía libre real depende de las concentraciones de reactivos y productos 499
Las variaciones de energía libre estándar son aditivas 500

13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes 501
Las ecuaciones bioquímicas y químicas no son idénticas 506

13.3 Transferencia de grupos fosforilo y ATP 507
La variación de energía libre en la hidrólisis del ATP es grande y negativa 507
Otros compuestos fosforilados y tioésteres también tienen energías libres de hidrólisis elevadas 509
El ATP proporciona energía por transferencia de grupo y no por simple hidrólisis 510
El ATP dona grupos fosforilo, pirofosforilo, y adenililo 513
La formación de macromoléculas informativas requiere energía 514
El ATP aporta energía para el transporte activo y la contracción muscular 514
Las transfosforilaciones entre nucleótidos se dan en todos los tipos celulares 514
RECUADRO 13-1 **Los destellos de la luciérnaga: informes resplandecientes del ATP 515**
El polifosfato inorgánico es un dador potencial de grupos fosforilo 516

13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas 517
El flujo de electrones puede realizar trabajo biológico 517
Las óxido-reducciones se pueden describir en forma de semirreacciones 517
En las oxidaciones biológicas interviene c on frecuencia la deshidrogenación 518
Los potenciales de reducción son una medida de la afinidad por los electrones 519
La oxidación celular de glucosa a dióxido de carbono requiere transportadores de electrones especializados 521
Unos pocos tipos de coenzimas y proteínas actúan como transportadores universales de electrones 521
El NADH y el NADPH actúan con las deshidrogenasas como transportadores solubles de electrones 522
Además de la transferencia electrónica El NAD tiene otras funciones importantes 524
La carencia de niacina, forma vitamínica del NAD y del NADP, en la dieta produce pelagra 524
Los nucleótidos de flavina están fuertemente unidos en las flavoproteínas 524

Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato 533

14.1 Glucólisis 534
Una visión global: la glucólisis tiene dos fases 534
La fase preparatoria de la glucólisis precisa ATP 538
La fase de beneficios de la glucólisis produce ATP y NADH 540
El balance global muestra una ganancia neta de ATP 544

COPY-STATION

La glucólisis está sometida a una regulación estricta 545
La captación de glucosa es deficiente en la diabetes mellitus tipo 1 545
RECUADRO 14-1 MEDICINA La alta velocidad de la glucólisis en los tumores sugiere dianas para la quimioterapia y facilita el diagnóstico 546

14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis 549
Los polisacáridos y disacáridos de la dieta se hidrolizan a monosacáridos 549
El glucógeno y el almidón endógenos se degradan mediante fosforólisis 550
Otros monosacáridos pueden entrar en diferentes puntos de la ruta glucolítica 551

14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación 552
El piruvato es el aceptor electrónico terminal en la fermentación láctica 552
El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica 553
RECUADRO 14-2 Atletas, caimanes y celacantos: la glucólisis en condiciones limitantes de oxígeno 554
La tiamina pirofosfato transporta grupos "aldehído activos" 555
Algunas fermentaciones microbianas dan lugar a algunos alimentos comunes y productos químicos industriales 555
RECUADRO 14-3 Fermentacions alcohólicas: elaboración de la cerveza y producción de biocombustibles 556

14.4 Gluconeogénesis 557
La conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato requiere dos reacciones exergónicas 558
La conversión de la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato constituye el segundo rodeo 561
La conversión de la glucosa-6-fosfato en glucosa constituye el tercer rodeo 562
La gluconeogénesis es energéticamente cara, pero es esencial 562
Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y muchos aminoácidos son glucogénicos 562
Los mamíferos no pueden convertir los ácidos grasos en glucosa 563
La glucólisis y la gluconeogénesis están reguladas de forma recíproca 563

14.5 Ruta de las pentosas fosfato para la oxidación de la glucosa 564
La fase oxidativa produce pentosas fosfato y NADPH 565
La fase no oxidativa recicla las pentosas fosfato a glucosa 6-fosfato 565
RECUADRO 12-4 MEDICINA ¿Por qué Pitágoras no comía falafel?: Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 566
Un defecto en la transcetolasa agrava el síndrome de Wernicke-Korsakoff 568
La glucosa 6-fosfato se reparte entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato 568

Principios de regulación metabólica 573

15.1 Regulación de las rutas metabólicas 574
Las células y organismos mantienen un estado estacionario dinámico 575
Se pueden regular tanto la cantidad como la actividad catalítica de un enzima 575
En las células las reacciones lejos del equilibrio constituyen puntos comunes de regulación 578
Los nucleótidos de adenina juegan un papel especial en la regulación metabólica 580

15.2 Análisis del control metabólico 582
Se puede medir experimentalmente la contribución de cada enzima al flujo a través de la ruta 582
El coeficiente de control de flujo cuantifica el efecto de un cambio en una actividad enzimática sobre el flujo metabólico a través de una ruta 583
El coeficiente de elasticidad está relacionado con la sensibilidad de un enzima a cambios en la concentración de metabolito o de regulador 583
El coeficiente de respuesta expresa el efecto de un controlador externo sobre el flujo a través de una ruta 583
RECUADRO 15-1 MÉTODOS Análisis del control metabólico: Aspectos cuantitativos 584
El análisis del control metabólico se ha aplicado al metabolismo glucídico con resultados sorprendentes 585
El análisis del control metabólico sugiere un método general para incrementar el flujo a través de una ruta 586

15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis 587
RECUADRO 15-2 Isozimas: Proteínas diferentes que catalizan la misma reacción 588
Los isozimas de la hexoquinasa de músculo y de hígado están afectados de forma diferente por su producto, la glucosa 6-fosfato 588
La hexoquinasa IV (glucoquinasa) y la fructosa 6-fosfatasa están reguladas a nivel de transcripción 589
La fosfofructoquinasa-1 y la fructosa 1,6-bisfosfatasa se regulan recíprocamente 590
La fructosa 2,6-bisfosfato es un regulador alostérico potente de la PFK-1 y de la FBPasa-1 591
La xilulosa 5-fosfato es un regulador clave de los metabolismos glucídico y lípidico 592
El enzima glucolítico piruvato quinasa es inhibido alostéricamente por el ATP 592
La conversión gluconeogénica del piruvato en fosfoenol piruvato se encuentra bajo múltiples tipos de regulación 593
La regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis por cambios en la transcripción hace variar el número de moléculas de enzima 594
RECUADRO 15-3 MEDICINA Mutaciones genéticas causantes de formas raras de diabetes 597

15.4 Metabolismo del glucógeno en animales 598
La degradación del glucógeno está catalizada por la glucógeno fosforilasa 599

COPYSTATION

La glucosa 1-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, reponer la glucosa sanguínea 599
El nucleótido-azúcar UDP-glucosa aporta glucosa para la síntesis de glucógeno 600
La glucogenina incorpora los residuos iniciales de azúcar del glucógeno 602

15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno 603
La glucogéno fosforilasa está sujeta a control alostérico y hormonal 604
RECUADRO 15-4 **Carl y Gerty Cori: Pioneros del metabolismo y enfermedades del glucógeno 606**
La glucógeno sintasa también está regulada por fosforilación y desfosforilación 607
La glucógeno sintasa quinasa 3 interviene en algunas acciones de la insulina 608
La fosfoproteína fosfatasa 1 es clave para el metabolismo del glucógeno 609
El metabolismo glucídico está globalmente coordinado por señales alostéricas y hormonales 609
El metabolismo de glúcidos y de lípidos está integrado mediante mecanismos hormonales y alostéricos 611

El ciclo del ácido cítrico 617

16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activo) 617
El piruvato se oxida a acetil-CoA y CO_2 618
El complejo de la piruvato deshidrogenasa necesita cinco coenzimas 619
El complejo de la piruvato deshidrogenasa está formado por tres enzimas diferentes 619
En la canalización de sustratos, los intermedios nunca abandonan la superficie enzimática 620

16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico 622
La secuencia de reacciones en el ciclo del ácido cítrico son lógicas desde el punto de vista químico 622
El ciclo del ácido cítrico consta de ocho pasos 624
RECUADRO 16-1 **Enzimas "claro de luna": proteínas con más de una función 626**
RECUADRO 16-2 **Sintasas y sintetasas; ligasas y liasas; quinasas, fosfatasas y fosforilasas: sí, ¡una nomenclatura confusa! 629**
La energía de las oxidaciones del ciclo se conserva eficientemente 631
RECUADRO 16-3 **Citrato: una molécula simétrica que reacciona asimétricamente 632**
¿Por qué es tan complicada la oxidación del acetato? 633
Los componentes del ciclo del ácido cítrico son importantes intermediarios biosintéticos 634
Las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios del ciclo del ácido cítrico 634
La biotina de la piruvato carboxilasa transporta grupos CO_2 635

16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico 637
La producción de acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa está regulada por mecanismos alostéricos y covalentes 637
El ciclo del ácido cítrico está regulado en sus tres pasos exergónicos 638
En el ciclo del ácido cítrico puede darse la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos 639
Algunas mutaciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico producen cáncer 639

Catabolismo de los ácidos grasos 647

17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas 648
Las grasas de la dieta se absorben en el intestino delgado 648
Las hormonas activan la movilización de triacilgliceroles almacenados 649
Los ácidos grasos son activados y transportados al interior de las mitocondrias 650

17.2 Oxidación de los ácidos grasos 652
La β-oxidación de los ácidos grasos saturados se produce en cuatro pasos básicos 653
Los cuatro pasos de la β-oxidación se repiten para generar acetil-CoA y ATP 654
El acetil-CoA puede continuar oxidándose vía ciclo del ácido cítrico 655
RECUADRO 17-1 **Una siesta que dura un largo invierno: la oxidación de grasas durante la hibernación 656**
La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos reacciones adicionales 657
La oxidación completa de ácidos grasos de cadena impar requiere tres reacciones adicionales 658
La oxidación de ácidos grasos está estrictamente regulada 659
RECUADRO 17-2 **Coenzima B_{12}: una solución radical a un problema desconcertante 660**
La síntesis de proteínas para el catabolismo lipídico es activada por factores de transcripción 662
Defectos genéticos de las acil graso-CoA deshidrogenasas producen enfermedades graves 662
Los peroxisomas también llevan a cabo la β-oxidación 662
Los enzimas de la β-oxidación de diferentes orgánulos han tenido una evolución divergente 663
En el retículo endoplasmático tiene lugar la ω-oxidación de los ácidos grasos 664
El ácido fitánico experimenta α oxidación en los peroxisomas 665

17.3 Cuerpos cetónicos 666
Los cuerpos cetónicos formados en el hígado se exportan a otros órganos como combustible 666
Durante la diabetes y en situaciones de inanición se da una sobreproducción de cuerpos cetónicos 667

Oxidación de aminoácidos y producción de urea 673

18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino 674
La proteína de la dieta se degrada enzimáticamente a aminoácidos 675
El piridoxal fosfato participa en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato 677
El glutamato libera su grupo amino en forma de amoníaco en el hígado 677
La glutamina transporta amoníaco en el torrente circulatorio 678
La alanina transporta amoníaco desde los músculos esqueléticos al hígado 680
El amoníaco es tóxico para los animales 680

COPY-STATION

18.2 Excreción del nitrógeno y ciclo de la urea 681
La urea se produce a partir de amoníaco en cinco pasos enzimáticos 682
Los ciclos del ácido cítrico y de la urea pueden conectarse 682
La actividad del ciclo de la urea está regulada a dos niveles 684
RECUADRO 18-1 **MEDICINA Determinación de lesiones tisulares 686**
Las interconexiones entre rutas reducen el coste energético de la síntesis de urea 686
Defectos genéticos en el ciclo de la urea pueden ser letales 686

18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos 687
Algunos aminoácidos se convierten en glucosa, otros en cuerpos cetónicos 688
Varios cofactores enzimáticos tienen papeles importantes en el catabolismo de los aminoácidos 688
Seis aminoácidos se degradan a piruvato 691
Siete aminoácidos se degradan a acetil-CoA 694
En algunas personas el catabolismo de la fenilalanina es genéticamente defectuoso 695
Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato 698
Cuatro aminoácidos se convierten en succinil-CoA 698
RECUADRO 18-2 **MEDICINA Detectives científicos resuelven un crimen misterioso 700**
Los aminoácidos ramificados no se degradan en el hígado 700
La asparagina y el aspartato se degradan a oxalacetato 702

Fosforilación oxidativa 707

19.1 La cadena respiratoria mitocondrial 708
Los electrones son canalizados hacia transportadores universales de electrones 708
Los electrones pasan a través de una serie de transportadores unidos a membrana 710
Los transportadores de electrones actúan en complejos multienzimáticos 713
Los complejos mitocondriales se pueden asociar formando respirasomas 719
Otras rutas ceden electrones a la cadena respiratoria a través de la ubiquinona 719
RECUADRO 19-1 **MÉTODOS Determinación de estructuras tridimensionales de grandes complejos macromoleculares por criomiscroscopia electrónica de partícula única 720**
La energía de la transferencia de electrones se conserva eficientemente en un gradiente de protones 720
Durante la fosforilación oxidativa se producen especies de oxígeno reactivas 722
Las mitocondrias de plantas tienen mecanismos alternativos para oxidar el NADH 723
RECUADRO 19-2 **Calor, plantas malolientes y rutas respiratorias alternativas 724**

19.2 Síntesis de ATP 724
En el modelo quimiosmótico la oxidación y la fosforilación están obligatoriamente acopladas 724
La ATP sintasa tiene dos dominios funcionales, F_o y F_1 727
En la superficie de F_1 el ATP está estabilizado en relación al ADP 728
El gradiente de protones impulsa la liberación del ATP de la superficie del enzima 728
Cada subunidad β de la ATP sintasa puede adoptar tres conformaciones diferentes 729
La catálisis rotacional es la clave en el mecanismo de unión y cambio de la síntesis de ATP 729
¿De qué modo el flujo protónico a través del Complejo F_o produce movimiento rotatorio? 731
RECUADRO 19-3 **MÉTODOS Microscopia de fuerza atómica para visualizar las proteínas de membrana 733**
El acoplamiento quimiosmótico permite que las estequiometrías del consumo de O_2 y de la síntesis de ATP no se correspondan con números enteros 733
La fuerza protón-motriz suministra energía para el transporte activo 734
Sistemas de lanzadera envían indirectamente NADH citosólico a la mitocondria para su oxidación 735

19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa 736
La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades celulares de energía 737
Una proteína inhibidora impide la hidrólisis de ATP durante la hipoxia 737
La hipoxia conduce a la producción de ROS y varias respuestas de adaptación 737
Las rutas de formación de ATP están reguladas de forma coordinada 739

19.4 Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis 740
Las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón producen calor 740
Las monooxigenasas P-450 mitocondriales catalizan las hidroxilaciones de esteroides 740
Las mitocondrias son de importancia crucial en el inicio de la apoptosis 741

19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de las mutaciones 741
Las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas 742
En el DNA mitocondrial se acumulan mutaciones a lo largo de la vida del organismo 743
Algunas mutaciones en los genomas mitocondriales producen enfermedades 744
Defectos en las mitocondrias de las células β pancreáticas pueden ser causa de diabetes 745

Fotosíntesis y síntesis de glúcidos en plantas 751

20.1 Absorción de la luz 752
Los cloroplastos son el sitio del flujo electrónico y de la fotosíntesis impulsados por la luz en los vegetales 752
Las clorofilas absorben energía luminosa para la fotosíntesis 755
Los pigmentos accesorios aumentan la gama de absorción de la luz 755
La clorofila canaliza la energía absorbida a centros de reacción mediante transferencia de excitones 756

20.2 Centros de reacción fotoquímicos 758
Las bacterias fotosintéticas tienen dops tipos de centros de reacción 758
Factores cinéticos y termodinámicos evitan la disipación de energía por conversión interna 761

COPY STATION

Dos centros de reacción actúan en tándem en las plantas 762
El flujo cíclico de electrones entre PSI y el complejo del citocromo b_6f aumenta la producción de ATP en relación a la de NADPH 765
Transiciones de estado cambian la distribución de LHCII entre los dos fotosistemas 766
El agua es escindida por el complejo que desprende oxígeno 768

20.3 Síntesis de ATP por fotofosforilación 769
Un gradiente de protones acopla el flujo electrónico con la fosforilación 770
Se ha establecido la estequiometría aproximada de la fotofosforilación 770
La ATP sintasa de los cloroplastos se parece a la de la mitocondria 771

20.4 Evolución de la fotosíntesis oxigénica 771
Los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas 772
En *Halobacterium* una única proteína absorbe luz y bombea protones para impulsar la síntesis de ATP 773

20.5 Reacciones de asimilación del carbono 775
La asimilación del dióxido de carbono tiene lugar en tres fases 777
Cada triosa fosfato sintetizada a partir de CO_2 cuesta seis NADPH y nueve ATP 779
Un sistema de transporte exporta triosas fosfato desde el cloroplasto e importa fosfato 781
Cuatro enzimas del ciclo de Calvin son activadas indirectamente por la luz 783

20.6 Fotorrespiración y rutas C4 y CAM 786
La fotorrespiración es el resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco 786
La ruta de recuperación del fosfoglicolato es costosa 787
RECUADRO 20-1 **¿Aumentará la ingeniería genética la eficiencia de los organismos fotosintéticos? 788**
En las plantas C_4, la fijación del CO_2 y la actividad rubisco tienen lugar en espacios separados 788
En las plantas CAM, la captura del CO_2 y la acción de la rubisco están separadas en el tiempo 791

20.7 Biosíntesis del almidón, sacarosa y celulosa 792
La ADP-glucosa es el sustrato de la síntesis de almidón en los plastidios de las plantas y de la síntesis de glucógeno en las bacterias 792
La UDP-glucosa es el sustrato de la síntesis de sacarosa en el citosol de las células de las hojas 792
La conversión de triosas fosfato en sacarosa y almidón está estrictamente regulada 793
El ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis producen glucosa en las semillas en germinación 794
La celulosa se sintetiza por estructuras supramoleculares de la membrana plasmática 796

20.8 Integración del metabolismo glucídico en vegetales 799
Fondos o reservas ("pools") de intermediarios comunes unen rutas en diferentes orgánulos 799

Biosíntesis de lípidos 805

21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides 805
El malonil-CoA se forma a partir del acetil-CoA y del bicarbonato 805
La síntesis de ácidos grasos transcurre mediante una secuencia de reacciones repetidas 806
El complejo de la ácido graso sintasa de mamíferos tiene múltiples sitios activos 808
La ácido graso sintasa recibe los grupos acetilo y malonilo 808
Las reacciones de la ácido graso sintasa se repiten hasta formar palmitato 810
La síntesis de ácidos grasos es un proceso citosólico de muchos organismos pero en las plantas tiene lugar en los cloroplastos 811
El acetato sale de la mitocondria en forma de citrato 812
La biosíntesis de ácidos grasos está muy regulada 812
Los ácidos grasos de cadena larga se sintetizan a partir del palmitato 814
La desaturación de los ácidos grasos necesita una oxidasa de función mixta 815
RECUADRO 21-1 **MEDICINA Oxidasas de función mixta, enzimas citocromo P-450 y sobredosis de fármacos 816**
Los icosanoides se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 carbonos 818

21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles 820
Los triacilgliceroles y glicerofosfolípidos se sintetizan a partir de los mismos precursores 820
La biosíntesis de triacilgliceroles en los animales está regulada por hormonas 821
El tejido adiposo genera glicerol 3-fosfato mediante gliceroneogénesis 823
Las tiazolidinodionas tratan la diabetes de tipo 2 incrementando la gliceroneogénesis 823

21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana 824
Las células tienen dos estrategias para unir los grupos de cabeza de los fosfolípidos 824
La síntesis de fosfolípidos en *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol 825
Los eucariotas sintetizan fosfolípidos aniónicos a partir del CDP-diacilglicerol 825
Las rutas eucarióticas hasta la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina están interrelacionadas 827
La síntesis de plasmalógeno requiere la formación de un alcohol graso unido por enlace éter 827
Las síntesis de esfingolípidos y glicerofosfolípidos comparten precursores y algunos mecanismos 828
Los lípidos polares están destinados a membranas celulares específicas 829

21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: Biosíntesis, regulación y transporte 830
El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en cuatro fases 831
El colesterol tiene varios destinos 834
Las lipoproteínas plasmáticas transportan el colesterol y otros lípidos 836
RECUADRO 21-2 **MEDICINA Los alelos de la Apo E predicen la incidencia de la enfermedad de Alzheimer 838**
Los ésteres de colesterol entran en las células por endocitosis facilitada por receptor 838
La HDL lleva a cabo el transporte de colesterol inverso 840

COPY-STATION

La síntesis y transporte del colesterol están regulados a diversos niveles 841
El metabolismo desregulado del colesterol puede ser causa de enfermedad cardiovascular 843
El transporte inverso del colesterol por la HDL se opone a la formación de placas y a la ateroesclerosis 844
RECUADRO 21-3 **MEDICINA La hipótesis lipídica y el desarrollo de las estatinas** **845**
Las hormonas esteroideas se forman por rotura de la cadena lateral y oxidación del colesterol 845
Los intermediarios de la síntesis del colesterol tienen muchos destinos alternativos 847

Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas 853

22.1 Visión general del metabolismo del nitrógeno 854
El ciclo del nitrógeno mantiene una reserva de nitrógeno disponible biológicamente 854
Enzimas del complejo de la nitrogenasa fijan el nitrógeno 855
RECUADRO 22-1 **Estilos de vida poco comunes de lo invisible pero abundante** **856**
El amoníaco se incorpora a las biomoléculas a través del glutamato y la glutamina 860
La glutamina sintetasa es un punto de regulación primario del metabolismo del nitrógeno 861
Varios tipos de reacciones tienen papeles específicos en la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos 862

22.2 Biosíntesis de los aminoácidos 863
El α-cetoglutarato es precursor del glutamato, la glutamina, la prolina y la arginina 864
La serina, la glicina y la cisteína proceden del 3-fosfoglicerato 866
Tres aminoácidos no esenciales y seis aminoácidos esenciales se sintetizan a partir de oxalacetato y piruvato 867
El corismato es un intermediario clave en la síntesis del triptófano, la fenilalanina y la tirosina 870
La biosíntesis de la histidina utiliza precursores de la biosíntesis de purinas 871
La biosíntesis de los aminoácidos se encuentra bajo control alostérico 873

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos 875
La glicina es un precursor de las porfirinas 875
El hemo es la fuente de los pigmentos biliares 876
RECUADRO 22-2 **MEDICINA Sobre reyes y vampiros** **878**
La biosíntesis de la creatina y del glutatión se realiza a partir de aminoácidos 878
Los D-aminoácidos se encuentran fundamentalmente en las bacterias 879
Los aminoácidos aromáticos son precursores de muchos compuestos presentes en los vegetales 880
Las aminas biógenas son productos de descarboxilación de los aminoácidos 880
La arginina es el precursor de la síntesis biológica del óxido nítrico 880

22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos 882
La síntesis de novo de los nucleótidos de purina empieza con el PRPP 883
La biosíntesis de los nucleótidos de purina está regulada por retroinhibición 885
Los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a partir de aspartato, PRPP y carbamil fosfato 885
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina está regulada por retroinhibición 886
Los nucleósidos monofosfato se convierten en nucleósidos trifosfato 887
Los ribonucleótidos son los precursores de los desoxirribonucleótidos 887
El timidilato se forma a partir de dCDP y dUMP 890
La degradación de las purinas y pirimidinas produce ácido úrico y urea, respectivamente 891
Las bases púricas y pirimidínicas se reciclan a través de vías de recuperación 892
La causa de la gota es una sobreproducción de ácido úrico 893
Muchos agentes quimioterápicos actúan sobre enzimas de las rutas de biosíntesis de nucleótidos 894

Regulación hormonal e integración del metabolismo de los mamíferos 899

23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas 899
La detección y la purificación de las hormonas requieren un bioensayo 900
RECUADRO 23-1 **MEDICINA ¿Cómo se descubre una hormona? El difícil camino hasta la insulina purificada** **901**
Las hormonas actúan a través de receptores celulares específicos de elevada afinidad 902
Las hormonas son químicamente diversas 903
La liberación de hormonas está regulada por señales neuronales y hormonales jerarquizadas "de arriba a abajo" 907
Sistemas hormonales "de abajo a arriba" envían señales de nuevo al cerebro y a otros tejidos 908

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo 910
El hígado transforma y distribuye los nutrientes 910
El tejido adiposo almacena y suministra ácidos grasos 914
Los tejidos adiposos marrón y beige son termogénicos 915
Los músculos utilizan ATP para realizar trabajo mecánico 916
RECUADRO 23-2 **Creatina y creatina quinasa: Valiosas ayudas para el diagnóstico y amigas de los culturistas** **918**
El cerebro consume energía para la transmisión de los impulsos eléctricos 920
La sangre transporta oxígeno, metabolitos y hormonas 921

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético 922
La insulina contrarresta la glucosa elevada en sangre 923
Las células b del páncreas secretan insulina en respuesta a cambios de la glucosa en sangre 923
El glucagón contrarresta los niveles de glucosa en sangre bajos 925
Durante el ayuno y la inanición el metabolismo se modifica para proporcionar combustible para el cerebro 927

COPY STATION

La adrenalina es la señal de una actividad inminente 929
El cortisol es un indicador de estrés, incluidos los bajos niveles de glucosa en sangre 930
La diabetes mellitus es un defecto en la producción o en la acción de la insulina 930

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal 931
El tejido adiposo tiene importantes funciones endocrinas 931
La leptina estimula la producción de hormonas peptídicas anorexigénicas 933
La leptina desencadena una cascada de señalización que regula la expresión génica 933
El sistema de la leptina puede haber evolucionado para regular la respuesta a la inanición 934
La insulina también actúa en el núcleo arcuato para regular la ingesta y la conservación de energía 934
La adiponectina actúa a través de la AMPK para aumentar la respuesta a la insulina 935
La AMPK coordina catabolismo y anabolismo en respuesta al estrés metabólico 935
La ruta mTORC1 coordina el crecimiento celular con el suministro de nutrientes y energía 936
La dieta regula la expresión de genes cruciales para el mantenimiento de la masa corporal 937
La grelina, la PYY_{3-36} y los cannabinoides influyen en los hábitos de ingesta a corto plazo 938
Simbiontes microbianos del intestino influyen sobre el metabolismo energético y la adipogénesis 940

23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2 941
En la diabetes tipo 2 los tejidos se vuelven insensibles a la insulina 941
La diabetes tipo 2 se trata con dieta, ejercicio, y medicación y cirugía 942

III LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN 949

Genes y cromosomas 951

24.1 Componentes cromosómicos 951
Los genes son segmentos de DNA que codifican cadenas polipeptídicas y RNA 951
Las moléculas de DNA son mucho más largas que las células o virus que las contienen 952
Los genes y los cromosomas eucarióticos son muy complejos 955

24.2 Superenrollamiento del DNA 957
La mayor parte del DNA celular se encuentra subenrollado 958
El subenrollamiento del DNA se define por el número de enlace topológico 959
Las topoisomerasas catalizan cambios en el número de enlace del DNA 961
RECUADRO 24-1 **MEDICINA Curación de enfermedades mediante la inhibición de topoisomerasas 964**
La compactación del DNA requiere una forma especial de superenrollamiento 964

24.3 La estructura de los cromosomas 966
La cromatina está compuesta de DNA y proteínas 966
Las histonas son pequeñas proteínas básicas 967
Los nucleosomas son las unidades fundamentales de organización de la cromatina 967
Los nucleosomas se empaquetan en estructuras cromosómicas altamente condensadas 969
RECUADRO 24-2 **MÉTODOS Epigenética; estructura de los nucleosomas y variantes de las histones 970**
Las estructuras de los cromosomas condensados se mantienen mediante proteínas SMC 974
El DNA bacteriano también se encuentra altamente organizado 975

Metabolismo del DNA 979

25.1 Replicación del DNA 981
La replicación del DNA está gobernada por un conjunto de reglas fundamentales 981
El DNA es degradado por nucleasas 983
El DNA es sintetizado por DNA polimerasas 983
La replicación es muy precisa 984
E. coli posee al menos cinco DNA polimerasas 985
La replicación del DNA requiere muchos enzimas y factores proteicos 987
La replicación del cromosoma de *E. coli* procede por etapas 988
La replicación en las células eucarióticas es similar pero más compleja 994
Las DNA polimerasas víricas son dianas de las terapias antivíricas 996

25.2 Reparación del DNA 997
Las mutaciones están relacionadas con el cáncer 997
Todas las células tienen múltiples sistemas de reparación del DNA 997
La interacción de las horquillas de replicación con lesiones del DNA puede inducir síntesis de DNA propensa al error a través de la lesión 1003

25.3 Recombinación del DNA 1005
RECUADRO 25-1 **MEDICINA Reparación del DNA y Cáncer 1007**
La recombinación homóloga en las bacterias es un proceso de reparación del DNA 1008
La recombinación homóloga eucariótica es necesaria para la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis 1011
La recombinación durante la meiosis se inicia en roturas de cadena doble 1012
RECUADRO 25-2 **MEDICINA Por qué es importante la segregación correcta de los cromosomas 1014**
Algunas rupturas de la doble hebra de DNA se reparan por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) 1015
La recombinación específica de sitio produce reordenamientos precisos del DNA 1016
Los elementos genéticos transponibles se mueven de un lugar a otro 1018
Los genes de las inmunoglobulinas se forman por recombinación 1020

Metabolismo del RNA 1027

26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA 1028
El RNA es sintetizado por RNA polimerasas 1028
La síntesis del RNA empieza en los promotores 1030
La transcripción está regulada a diferentes niveles 1031
RECUADRO 26-1 **MÉTODOS La RNA polimerasa deja su huella en un promotor 1032**

COPY-STATION

La terminación de la síntesis del RNA está señalizada por secuencias específicas 1033
Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares 1034
La RNA polimerasa II requiere muchos factores proteicos adicionales para su actividad 1034
La RNA polimerasa dependiente de DNA es inhibida selectivamente 1038

26.2 Maduración del RNA 1039
Los mRNA eucarióticos poseen un casquete en el extremo 5' 1040
Intrones y exones se transcriben del DNA al RNA 1041
El RNA cataliza el corte y empalme de los intrones 1041
Los mRNA eucarióticos tienen una estructura característica en el extremo 3' 1045
La maduración diferencial del RNA puede dar lugar a múltiples productos a partir de un gen 1045
Los RNA ribosómicos y los tRNA también son modificados 1047
Los RNA de función especializada experimentan varios tipos de maduración 1050
Algunas etapas del metabolismo del RNA están catalizadas por enzimas de RNA 1051
Los mRNA celulares se degradan a diferentes velocidades 1053
La polinucleótido fosforilasa forma polímeros de RNA de secuencia aleatoria 1054

26.3 Síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA 1055
La transcriptasa inversa produce DNA a partir de RNA vírico 1055
Algunos retrovirus provocan cáncer y SIDA 1057
Muchos transposones, retrovirus e intrones pueden tener un origen evolutivo común 1057
La telomerasa es una transcriptasa inversa especializada 1058
RECUADRO 26-2 **MEDICINA Tratamiento del SIDA con inhibidores de la transcriptasa inversa del vih 1059**
Algunos RNA se replican mediante una RNA polimerasa dependiente de RNA 1060
La síntesis de RNA ofrece pistas sobre el origen de la vida en un mundo de RNA 1062
RECUADRO 26-3 **MÉTODOS El método SELEX para generar polímeros de RNA con nuevas funciones 1063**

Metabolismo de las proteínas 1069

27.1 El código genético 1069
El código genético fue descifrado mediante moldes de mRNA artificiales 1070
RECUADRO 27-1 **Excepciones que confirman la regla: variaciones naturales del código genético 1074**
El balanceo permite que algunos tRNA reconozcan más de un codón 1076
El código genético es resistente a las mutaciones 1077
El desplazamiento del marco de traducción y la edición de RNA afectan la lectura del código 1077

27.2 Síntesis de proteínas 1080
La biosíntesis de las proteínas tiene lugar en cinco fases 1080
El ribosoma es una compleja máquina supramolecular 1081
Los RNA de transferencia tienen rasgos estructurales característicos 1083
Etapa 1: Las aminoacil-tRNA sintetasas unen los aminoácidos correctos a sus tRNA 1084
Etapa 2: La síntesis de proteínas empieza con un aminoácido específico 1089
RECUADRO 27-2 **Expansión natural y no natural del código genético 1090**
Etapa 3: Los enlaces peptídicos se forman durante la fase de elongación 1095
Etapa 4: La terminación de la síntesis de polipéptidos requiere una señal específica 1098
RECUADRO 27-3 **Variación inducida en el código genético: Supresión de mutaciones sin sentido 1100**
Etapa 5: Plegamiento y modificación de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas 1100
El perfil ribosomal proporciona una instantánea de la traducción celular 1103
La síntesis de proteínas es inhibida por muchos antibióticos y toxinas 1103

27.3 Destino y degradación de las proteínas 1105
La modificación postraducción de muchas proteínas eucarióticas empieza en el retículo endoplasmático 1105
La glucosilación juega un papel clave en el destino de las proteínas 1106
Las secuencias señal para el transporte nuclear no son cortadas 1109
Las bacterias también utilizan secuencias señal para el destino de las proteínas 1109
Las células importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptores 1111
Todas las células disponen de sistemas de degradación de proteínas especializados 1112

Regulación de la expresión génica 1119

28.1 Principios de Regulación Génica 1120
La RNA polimerasa se une al DNA en los promotores 1120
El inicio de la transcripción se regula mediante proteínas que se unen a los promotores o cerca de ellos 1121
Muchos genes bacterianos están agrupados y se regulan en operones 1123
El operón *lac* está sujeto a regulación negativa 1124
Las proteínas reguladoras tienen dominios independientes de unión al DNA 1125
Las proteínas reguladoras también tienen dominios de interacción proteína-proteína 1128

28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias 1130
El Operón *lac* está sujeto a regulación positiva 1130
Muchos genes de los enzimas de la biosíntesis de aminoácidos se regulan por atenuación de la transcripción 1131
La inducción de la respuesta SOS requiere la destrucción de proteínas represoras 1134
La síntesis de proteínas ribosómicas está coordinada con la síntesis de rRNA 1135
La función de algunos mRNA está regulada por pequeños RNA en cis o en trans 1136
Algunos genes se regulan por recombinación genética 1138

28.3 Regulación de la expresión génica en eucariotas 1139

COPYSTATION

La cromatina transcripcionalmente activa es estructuralmente diferente de la cromatina inactiva 1140
La mayoría de promotores eucarióticos se regula positivamente 1141
Los activadores y coactivadores de unión al DNA facilitan el ensamblaje de los factores de transcripción generales 1142
Los genes del metabolismo de la galactosa en levaduras están sujetos a la vez a regulación positiva y negativa 1145
Los activadores de la transcripción tienen estructura modular 1145
La expresión génica eucariótica puede ser regulada por señales intercelulares e intracelulares 1146
La fosforilación de los factores de transcripción nucleares puede contribuir a su regulación 1148
Muchos mRNA eucarióticos están sometidos a represión traduccional 1149
El silenciamiento postranscripcional de los genes se produce por interferencia mediante RNA 1150
La regulación de la expresión génica debida al RNA adopta múltiples formas en eucariotas 1151
El desarrollo está controlado por cascadas de proteínas reguladoras 1151
El potencial de desarrollo de las células madre puede controlarse 1157
RECUADRO 28-1 **Aletas, alas, picos y otras estructuras** 1158

Soluciones abreviadas de los Problemas SA-1
Glosario G-1
Índice I-1

CAPÍTULO 1

Fundamentos de la Bioquímica

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

1.1 Fundamentos celulares 3

1.2 Fundamentos químicos 12

1.3 Fundamentos físicos 20

1.4 Fundamentos genéticos 30

1.5 Fundamentos evolutivos 32

Hace aproximadamente catorce mil millones de años, el universo nació de un cataclismo explosivo de partículas subatómicas extremadamente calientes y ricas en energía. En cuestión de segundos se formaron los elementos más simples, como el hidrógeno y el helio. Al tiempo que el universo se expandía y enfriaba, se condensaba la materia bajo la influencia de la gravedad y se formaban las estrellas. Algunas de ellas se hicieron enormes y explotaron como supernovas, liberando la energía necesaria para producir los elementos más complejos a partir de la fusión de núcleos atómicos más simples. Átomos y moléculas formaron masas turbulentas de partículas de polvo, cuya acumulación dio lugar a la formación de rocas, planetoides y planetas. De este modo aparecieron, a lo largo de miles de millones de años, la Tierra y los elementos químicos que en ella se encuentran. La vida apareció hace unos cuatro mil millones de años en forma de microorganismos sencillos dotados primeramente de la capacidad de extraer energía de los compuestos químicos y, más tarde, de la luz solar. Esta energía sirvió para generar una amplia variedad de **biomoléculas** a partir de los elementos y compuestos más simples presentes en la superficie de la Tierra. Nosotros y todos los demás organismos vivos estamos hechos de polvo de estrellas.

La Bioquímica se pregunta acerca de los mecanismos que hacen posible que miles de biomoléculas diferentes den lugar a las extraordinarias propiedades de los organismos vivos. Cuando estas moléculas se aíslan y examinan individualmente cumplen todas las leyes físicas y químicas que describen el comportamiento de la materia inanimada, del mismo modo que ocurre con todos los procesos que tienen lugar en organismos vivos. El estudio de la bioquímica muestra el modo en que las moléculas inanimadas que constituyen los organismos vivos interaccionan para mantener y perpetuar la vida, rigiéndose solamente por las mismas leyes físicas y químicas que gobiernan todo el universo.

A pesar de ello, los organismos poseen cualidades extraordinarias, que los distinguen de otras agrupaciones de materia. ¿Cuáles son, pues, las características distintivas de los organismos vivos?

Un elevado grado de complejidad química y de organización microscópica. Las intrincadas estructuras internas celulares están formadas por miles de moléculas diferentes **(Fig. 1-1a)**. Entre ellas se cuentan polímeros muy largos, cada uno de ellos con su propia secuencia de subunidades, su estructura tridimensional única y su gran capacidad para interaccionar de forma específica y selectiva con otras moléculas celulares.

La existencia de sistemas para la extracción, transformación y uso de energía del entorno (Fig. 1-1b), que permite a los organismos construir y mantener sus complejas estructuras y llevar a cabo trabajo mecánico, químico, osmótico y eléctrico. Ello se opone a la tendencia que toda materia tiene a degradarse hacia un estado más desordenado y a quedar finalmente en equilibrio con su entorno.

La existencia de funciones definidas para cada uno de los componentes de un organismo y la regulación de sus interacciones mutuas. Esto es cierto no únicamente para estructuras macroscópicas como hojas y tallos o corazón y pulmones, sino también para estructuras microscópicas intracelulares y para compuestos químicos individuales. La relación entre los componentes químicos de un organismo vivo es dinámica; los cambios en uno de los componentes producen cambios compensatorios en otro, de modo que el conjunto posee un carácter propio, más allá del de cada

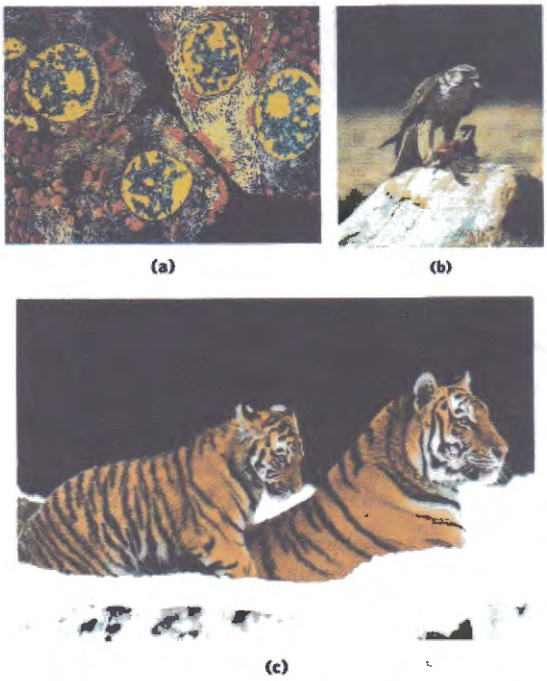


FIGURA 1-1 Algunas características de la materia viva. (a) En esta imagen coloreada de una sección fina de una célula secretora del páncreas vista a través del microscopio electrónico se aprecia su organización y complejidad microscópica. **(b)** Un halcón de las praderas adquiere nutrientes y energía consumiendo un pájaro más pequeño. **(c)** La reproducción biológica tiene lugar con fidelidad casi perfecta. [Fuente: (a) SPL/Science Source. (b) W. Perry Conway/Corbis. (c) Flonline digitale Bildagentur GmbH/Alamy].

una de sus partes individuales. El conjunto de moléculas lleva a cabo un programa que tiene como resultado final la reproducción del mismo y la perpetuación de este conjunto de moléculas; en definitiva, el resultado final es la vida.

Mecanismos para detectar y responder a las alteraciones en su entorno. Los organismos se ajustan constantemente a estos cambios gracias a la adaptación de sus procesos químicos internos o de su localización en el ambiente que los rodea.

La capacidad de autorreplicarse y autoensamblarse de manera precisa (Fig. 1-1c). Una única célula bacteriana colocada en un medio nutriente estéril puede generar mil millones de células "hija" idénticas a ella en 24 horas. Cada célula contiene miles de moléculas diferentes, algunas de ellas de una gran complejidad; a pesar de ello, cada bacteria es una copia fiel del original y toda la información para su construcción está contenida en el material genético de la célula original. En una escala superior, la progenie de los animales vertebrados comparte un notable parecido con sus progenitores, resultado también de la herencia de los genes parentales.

La capacidad de cambiar a lo largo del tiempo mediante evolución gradual. Los organismos varían sus estrategias vitales heredadas en pasos muy pequeños, para sobrevivir en situaciones nuevas. El resultado de eones de años de evolución es



FIGURA 1-2 Diferentes organismos vivos comparten características químicas comunes. Pájaros, bestias, plantas y microorganismos del suelo comparten con los humanos las mismas unidades estructurales básicas (células) y los mismos tipos de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) compuestas por los mismos tipos de subunidades monoméricas (nucleótidos, aminoácidos). Utilizan las mismas rutas de síntesis de los componentes celulares, comparten el mismo código genético y descienden de los mismos ancestros evolutivos. [Fuente: The Garden of Eden, 1659 (óleo sobre tela) de Jan van Kessel el Viejo (1626-79)/ Johnny van Haeften Gallery, London, UK/Bridgeman Images].

una enorme diversidad de formas de vida, superficialmente muy diferentes **(Fig. 1-2)** pero relacionadas en lo fundamental a través de sus ancestros comunes. Esta unidad fundamental de los organismos vivos se refleja a nivel molecular en la similitud de secuencias génicas y de estructuras de proteínas.

A pesar de la existencia de estas propiedades comunes y de uniformidad fundamental de la vida revelada por ellas, resulta difícil hacer generalizaciones sobre los organismos vivos. La diversidad de organismos en la Tierra es enorme. La gama de hábitats, desde aguas termales hasta la tundra ártica, desde el intestino animal hasta los dormitorios de residencias de estudiantes, tiene su reflejo en la gama igualmente amplia de adaptaciones bioquímicas específicas en el marco de en un entorno químico compartido. Con el objeto de primar la claridad de exposición, en este libro usaremos algunas generalizaciones que, aunque no perfectas, resultan útiles; con frecuencia también comentaremos algunas excepciones que pueden ayudar a aclarar las generalizaciones.

La bioquímica describe en términos moleculares las estructuras, mecanismos y procesos químicos compartidos por todos los organismos y define los principios de organización que subyacen en todas las diversas formas de vida. Aunque la bioquímica proporciona conocimientos y aplicaciones prácticas que son importantes en medicina, agricultura, nutrición e industria, su preocupación última es el prodigio de la vida misma.

En este capítulo introductorio describiremos de manera general los fundamentos celulares, químicos, físicos y genéticos de la bioquímica y el principio rector de la evolución, que describe de qué modo emergió la

vida y se ha desarrollado para dar lugar a todas las formas de vida existentes. Durante la lectura de este libro le puede resultar útil regresar a este capítulo de vez en cuando con el objeto de refrescar la memoria sobre estos temas básicos.

1.1 Fundamentos celulares

La unidad y diversidad de los organismos es evidente incluso a nivel celular. Los organismos más pequeños son unicelulares y microscópicos. Los organismos mayores, multicelulares, contienen muchos tipos de células variables en tamaño, forma y funciones especializadas. A pesar de estas diferencias obvias, todas las células de los organismos más simples y de los más complejos comparten ciertas propiedades fundamentales, que pueden ser observadas a nivel bioquímico.

Las células son las unidades estructurales y funcionales de todos los organismos vivos

Todas las células comparten ciertas características estructurales **(Fig. 1-3)**. La **membrana plasmática** define la periferia de la célula y separa su contenido del medio externo. Está compuesta por moléculas de lípidos y de proteínas que forman una fina barrera hidrofóbica, flexible y resistente alrededor de la célula. La membrana actúa como una barrera a la libre circulación de iones inorgánicos y de la mayor parte de compuestos cargados o polares. Las proteínas de transporte de la membrana plasmática permiten el paso de ciertos iones y moléculas; las proteínas receptoras transmiten señales hacia el interior de la célula; por su parte, los enzimas de membrana participan en algunas reacciones. Gracias a la interacción no covalente entre lípidos y proteínas de la membrana plasmática, la estructura global tiene un elevado grado de flexibilidad que permite que se produzcan cambios en la forma y el tamaño de la célula. Al crecer la célula, nuevas moléculas de lípido y proteína recién sintetizadas se insertan en la membrana plasmática; la división celular produce dos células, cada una de las cuales con su propia membrana. Este crecimiento y división (fisión) celulares se producen sin pérdida de la integridad de la membrana.

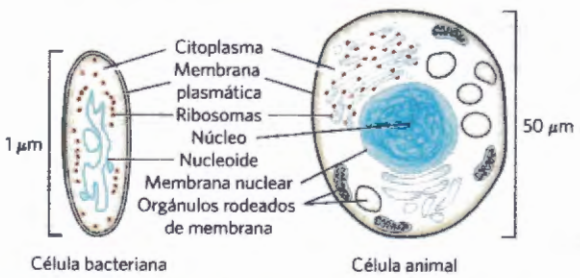


FIGURA 1-3 Características universales de las células vivas. Todas las células tienen un núcleo o nucleoide que contiene su DNA, una membrana plasmática y citoplasma. El citosol es la parte del citoplasma que permanece en el sobrenadante después de la rotura suave de la membrana plasmática y la centrifugación del extracto celular a 150.000 *g* durante 1 hora. Las células eucarióticas contienen diversos orgánulos rodeados de membrana (mitocondrias, cloroplastos) y partículas de gran tamaño (como por ejemplo los ribosomas) que sedimentan con esta centrifugación y se pueden recuperar a partir del sedimento.

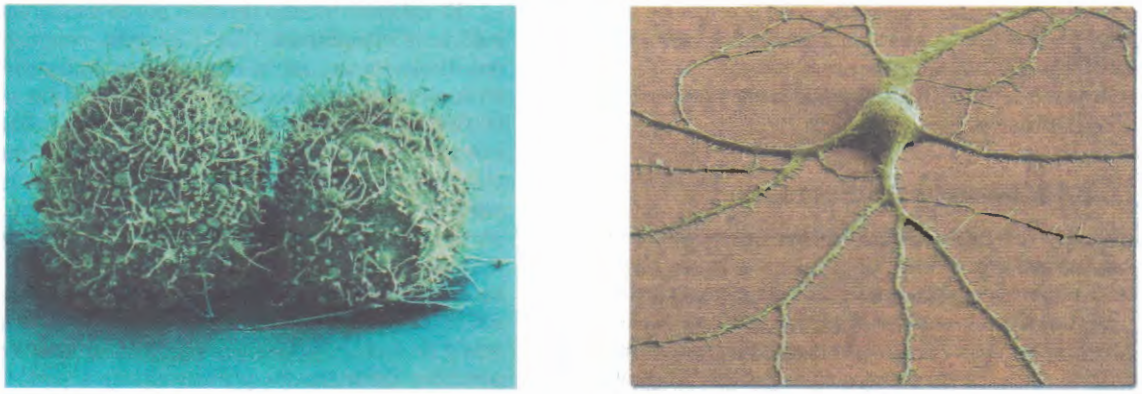
El volumen interno limitado por la membrana plasmática, el **citoplasma** (Fig. 1-3), está compuesto por una disolución acuosa, el **citosol**, y múltiples partículas en suspensión con funciones específicas. Estas partículas (orgánulos membranosos como las mitocondrias y los cloroplastos; estructuras supramacromoleculares tales como los **ribosomas** y los **proteasomas**, donde tiene lugar, respectivamente, la síntesis y la degradación de proteínas) sedimentan cuando se centrifuga el citoplasma a 150.000 *g* (*g* es la fuerza gravitacional de la Tierra). Lo que permanece como sobrenadante fluido es el citosol, una disolución muy concentrada que contiene enzimas y las moléculas de RNA que los codifican; los componentes (aminoácidos y nucleótidos) a partir de los cuales se forman estas macromoléculas; centenares de pequeñas moléculas orgánicas denominadas **metabolitos**, intermediarios de las rutas biosintéticas y degradativas; **coenzimas**, compuestos esenciales en muchas reacciones catalizadas enzimáticamente; y también iones inorgánicos (como por ejemplo K^+, Na^+, Mg^{2+} y Ca^{2+}).

Todas las células tienen, al menos durante una parte de su ciclo vital, un **nucleoide** o un **núcleo** en el que el **genoma** (el conjunto completo de genes, formados por DNA) se replica y se almacena junto con sus proteínas asociadas. En bacterias y arqueas el nucleoide no está separado del citoplasma por una membrana; en los **eucariotas** el núcleo está rodeado por una membrana doble, la envoltura nuclear. Las células que poseen envoltura nuclear constituyen el amplio dominio denominado Eukarya (del griego *eu*, "verdadero" y *kayron*, "núcleo"). Actualmente se considera que los microorganismos sin membrana nuclear, antes agrupados bajo el nombre de **procariotas** (del griego *pro*, "antes"), comprenden dos grupos, Bacteria y Arquea, que se describen más adelante.

Las dimensiones celulares están limitadas por la capacidad de difusión

La mayor parte de células son de tamaño microscópico, invisibles al ojo humano. El diámetro típico de las células animales y vegetales es de unos 5 a 100 μm, y muchos organismos unicelulares tienen una longitud de tan sólo 1 a 2 μm (véase la contracubierta posterior para encontrar información sobre las unidades y sus abreviaturas). ¿Qué es lo que limita las dimensiones de una célula? El límite inferior viene marcado probablemente por el número mínimo de cada una de las diferentes biomoléculas necesarias para la célula. Las células más pequeñas, ciertas bacterias conocidas como micoplasmas, tienen un diámetro de 300 nm y un volumen de aproximadamente 10^{-14} mL. Un solo ribosoma bacteriano tiene una longitud de aproximadamente 20 nm en su dimensión más alargada, de modo que un pequeño número de ribosomas ocupan ya una fracción significativa del volumen de una célula de micoplasma.

El límite superior del tamaño celular viene marcado por la velocidad de difusión de las moléculas disueltas en sistemas acuosos. Por ejemplo, una célula bacteriana que depende de reacciones que consumen oxígeno para la producción de su energía debe obtener el oxígeno molecular del medio en el que se encuentra mediante difusión a través de su membrana plasmática. La célula es tan pequeña y la relación entre el área de su superficie y su volumen tan grande, que el O_2 alcanza con faci-



(a) (b)

FIGURA 1-4 La mayoría de las células animales tienen superficies intrincadamente plegadas. Las micrografías electrónicas de barrido coloreadas muestran **(a)** la superficie altamente compleja de dos células HeLa, una línea de células de cáncer humano que se cultiva en el laboratorio, y **(b)** una neurona con sus muchas extensiones, cada una de ellas capaz de conectarse con otras neuronas. [Fuentes: (a) NIH National Institute of General Medical Sciences. (b) National Center for Microscopy & Imaging Research.]

lidad todas las partes de su citoplasma por difusión. Sin embargo, al aumentar el tamaño de la célula, desciende la relación superficie/volumen hasta llegar a un punto en el que su metabolismo consume O_2 a una velocidad superior a la suministrada por difusión. Así, el metabolismo que requiere O_2 se hará imposible cuando el tamaño celular crezca por encima de un determinado valor, que representa el límite superior teórico del tamaño de la célula. El oxígeno es tan solo una de las muchas especies de baja masa molecular que deben alcanzar diversas regiones del interior de la célula por difusión desde el exterior, y para todas ellas es válida la misma consideración sobre la relación superficie/volumen. Muchos tipos de células animales tienen superficies altamente plegadas y enrevesadas que incrementan su relación superficie-volumen, lo que permite una mayor capacidad de absorción de materiales del entorno **(Fig. 1-4)**.

Los organismos pertenecen a tres distintos dominios de la vida

El desarrollo de técnicas de bajo coste para la rápida determinación de secuencias de DNA ha mejorado mucho nuestra capacidad para deducir relaciones evolutivas entre organismos. Las similitud observada entre secuencias génicas de diferentes organismos proporcio-

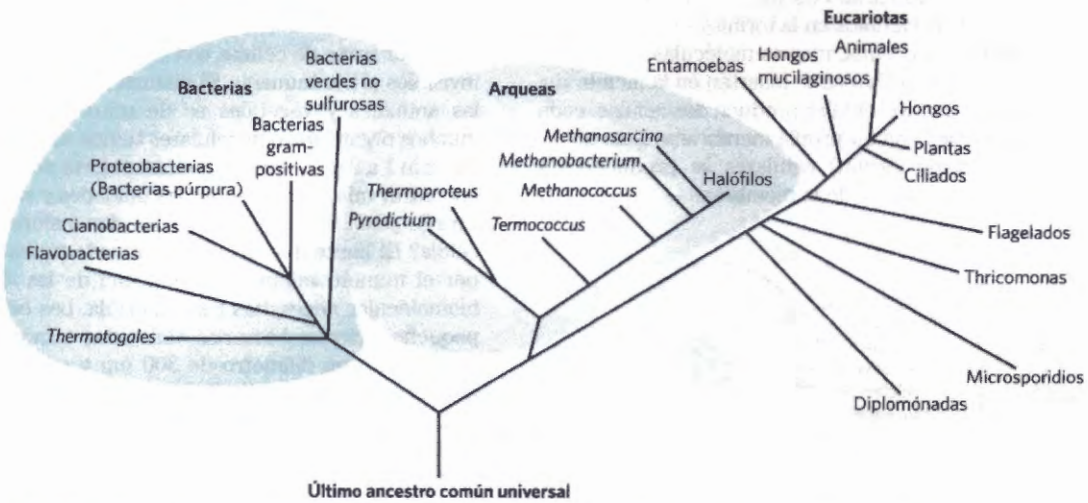


FIGURA 1-5 Filogenia de los tres dominios de la vida. Las relaciones filogenéticas se ilustran a menudo mediante un "árbol genealógico" de este tipo. Este árbol se basa en la similitud de las secuencias nucleotídicas de los RNA ribosómicos de cada uno de los grupos; a mayor similitud de secuencias, más cercanas estarán las ramas, con lo que la distancia entre ramas representa el grado de diferencia entre dos secuencias. También se pueden construir árboles filogenéticos a partir de similitudes entre las secuencias de aminoácidos de la misma proteína en especies diferentes. Por ejemplo, la comparación de las secuencias de la proteína GroEL (una proteína bacteriana que ayuda en el plegamiento de proteínas) generó el árbol de la Figura 3-35. El árbol de la Figura 3-36 es un árbol "consenso" que utiliza diversas comparaciones como las descritas para deducir la mejor de las estimaciones sobre la relación evolutiva en un grupo de organismos. Las secuencias genómicas de una amplia gama de bacterias, arqueas y eucariotas permiten también proponer un modelo de dos dominios en el que los eucariotas quedan incorporados dentro del dominio Arquea. El aumento del número de genomas secuenciados puede confirmar un modelo u otro como el que mejor se ajusta a los datos reales. [Fuente: Información de C.R. Woese, Microbiol. Rev. 51:221, 1987, Fig. 4.]

na un profundo conocimiento sobre el curso de la evolución. Según una interpretación de las similitudes en las secuencias, todos los organismos vivos pertenecen a uno de los tres grandes grupos (dominios) que definen las tres ramas del árbol evolutivo de la vida originado a partir de un progenitor común **(Fig. 1-5)**. En base a consideraciones bioquímicas y genéticas se pueden distinguir dos grandes grupos de organismos unicelulares: **Bacteria** y **Arquea**. Las bacterias habitan en el suelo, en las aguas superficiales y en los tejidos de otros organismos vivos o en descomposición. Muchas especies de Arquea (o Archaea), propuestas como un dominio distinto por Carl Woese en la década de 1980, habitan en medios muy extremos: lagos salinos, fuentes termales, ciénagas altamente acídicas y las profundidades de los océanos. Las pruebas de que se dispone sugieren que las arqueas y las bacterias divergieron pronto en el curso de la evolución. Todos los organismos eucarióticos, que constituyen el tercer dominio, **Eucaria** (o Eukarya), evolucionaron a partir de la misma rama que dio origen a los Arquea; los eucariotas están, por tanto, más estrechamente relacionados con las arqueas que con las bacterias.

Dentro de los dominios de Arquea y Bacteria existen subgrupos que se distinguen por sus hábitats. En los hábitats **aeróbicos**, con un abundante suministro de oxígeno, algunos organismos residentes obtienen su energía mediante la transferencia de electrones desde las moléculas de combustible al oxígeno dentro de la célula. Otros ambientes son **anaeróbicos**, prácticamente sin oxígeno, lo que obliga a que los microorganismos adaptados a ellos obtengan su energía mediante la transferencia de electrones hacia el nitrato (con generación de N_2), sulfato (con generación de H_2S), o CO_2 (con generación de CH_4). Muchos organismos que han evolucionado en ambientes anaeróbicos son anaerobios *obligatorios* que morirían por exposición al oxígeno. Otros son anaerobios *facultativos*, capaces de vivir con y sin oxígeno.

Los organismos difieren mucho respecto a fuentes de energía y precursores biosintéticos

Los organismos pueden clasificarse en base a su forma de obtener la energía y el carbono que necesitan para la síntesis de material celular (resumido en la **Fig. 1-6**). Se pueden establecer dos amplias categorías en base a las fuentes de energía: los **fotótrofos** (del griego *trophē*, "nutrición") recolectan y utilizan la luz solar, mientras que los **quimiótrofos** obtienen su energía a partir de la oxidación de combustibles químicos. Algunos quimiótrofos oxidan combustibles inorgánicos $-HS^-$ a S^0 (azufre elemental), S^0 a SO_4^-, NO_2^- a NO_3^-, o Fe^{2+} a Fe^{3+}, por ejemplo. Los fotótrofos y los quimiótrofos se pueden subdividir entre los que pueden sintetizar todas sus moléculas directamente a partir del CO_2 (**autótrofos**) y aquellos que requieren algunos nutrientes orgánicos previamente formados en otros organismos (**heteró-**

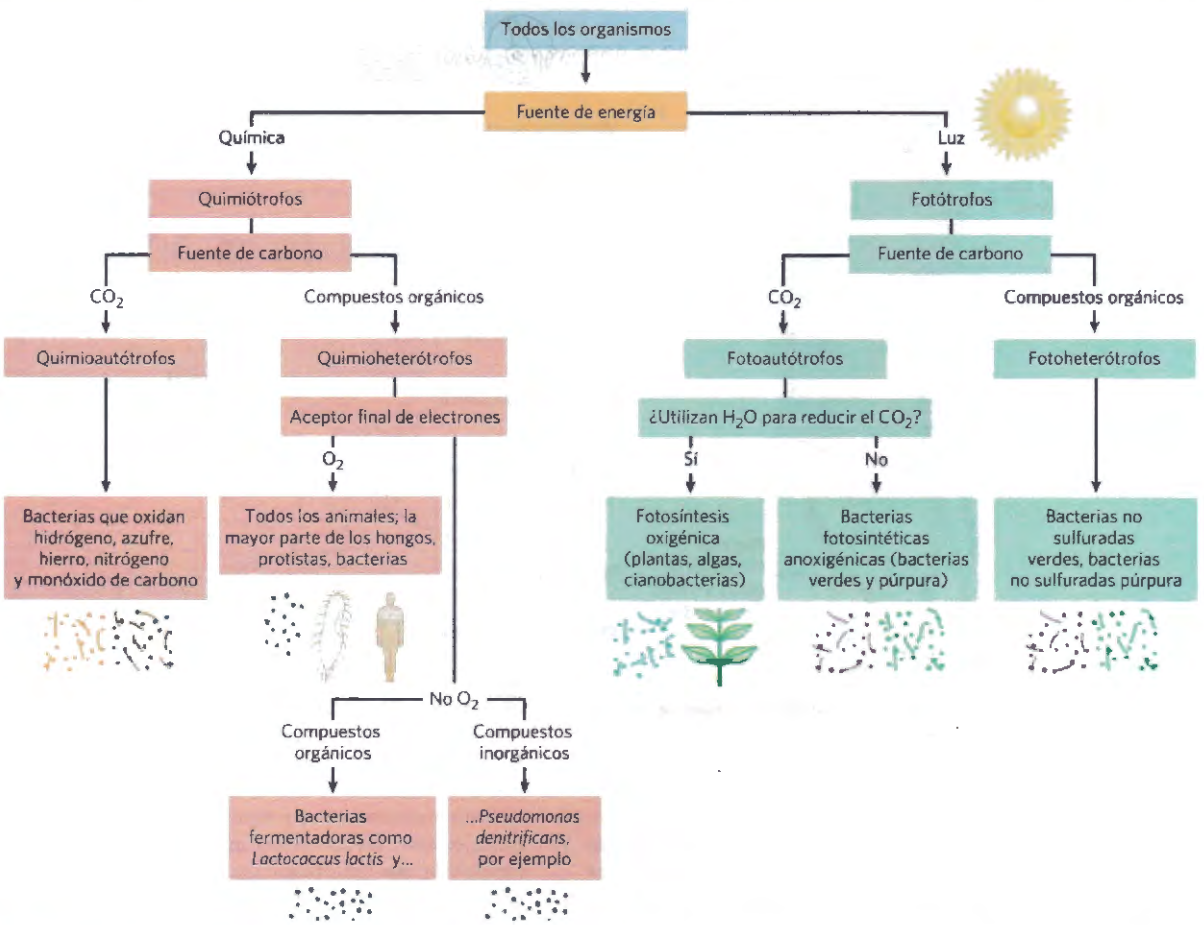


FIGURA 1-6 Los organismos pueden clasificarse según su fuente de energía (luz solar o compuestos químicos oxidables) y su fuente de carbono para la síntesis de material celular.

trofos). Combinando estos términos podemos describir el modelo de nutrición de un organismo. Incluso es posible establecer distinciones más detalladas, puesto que muchos organismos pueden obtener la energía y el carbono a partir de más de una fuente bajo diferentes condiciones ambientales y de desarrollo.

Bacterias y Arqueas comparten muchas características, pero difieren en muchos aspectos importantes

Escherichia coli, la bacteria mejor estudiada, es un inquilino habitualmente inofensivo del tracto intestinal humano. La célula de *E. coli* (**Fig. 1-7a**) es un ovoide de aproximadamente 2 µm de longitud y un poco menos de 1 µm de diámetro, pero otras bacterias pueden tener forma esférica o de varilla, y algunas son sustancialmente mayores. *E.* coli posee una membrana externa protectora y una membrana plasmática interna que engloba el citoplasma y el nucleoide. Entre las membranas interna y externa se sitúa una capa fina pero resistente de un polímero de elevada masa molecular (péptidoglucano) que proporciona a la célula su forma y rigidez características. La membrana plasmática y las capas que la rodean constituyen la **envoltura celular**. Las membranas plasmáticas de las bacterias están formadas por una fina bicapa de moléculas lipídicas en la que se insertan proteínas. Las membranas plasmáticas de las arqueas tienen una arquitectura similar, pero los lípidos pueden ser muy diferentes de los de las bacterias (vea la Fig. 10-11). Las bacterias y las arqueas presentan especializaciones específicas de grupo para sus envolturas celulares (Fig. 1-7b-d). Algunas bacterias, denominadas gram-positivas porque adquieren color con la tinción de Gram (introducida por Hans Peter Gram en 1882), tienen una densa capa de péptidoglucano en el exterior de su membrana plasmática, pero carecen de membrana externa. Las bacterias gram-negativas tienen una membrana externa formada por una bicapa lipídica en la que se insertan lipopolisacáridos complejos y proteínas denominadas porinas que forman canales transmembrana para la difusión de compuestos de baja masa molecular e iones. Las estructuras externas a la membrana plasmática difieren de organismo a organismo entre las arqueas, pero también ellas tienen una capa de péptidoglucano o de proteína que confiere rigidez a sus envolturas celulares.

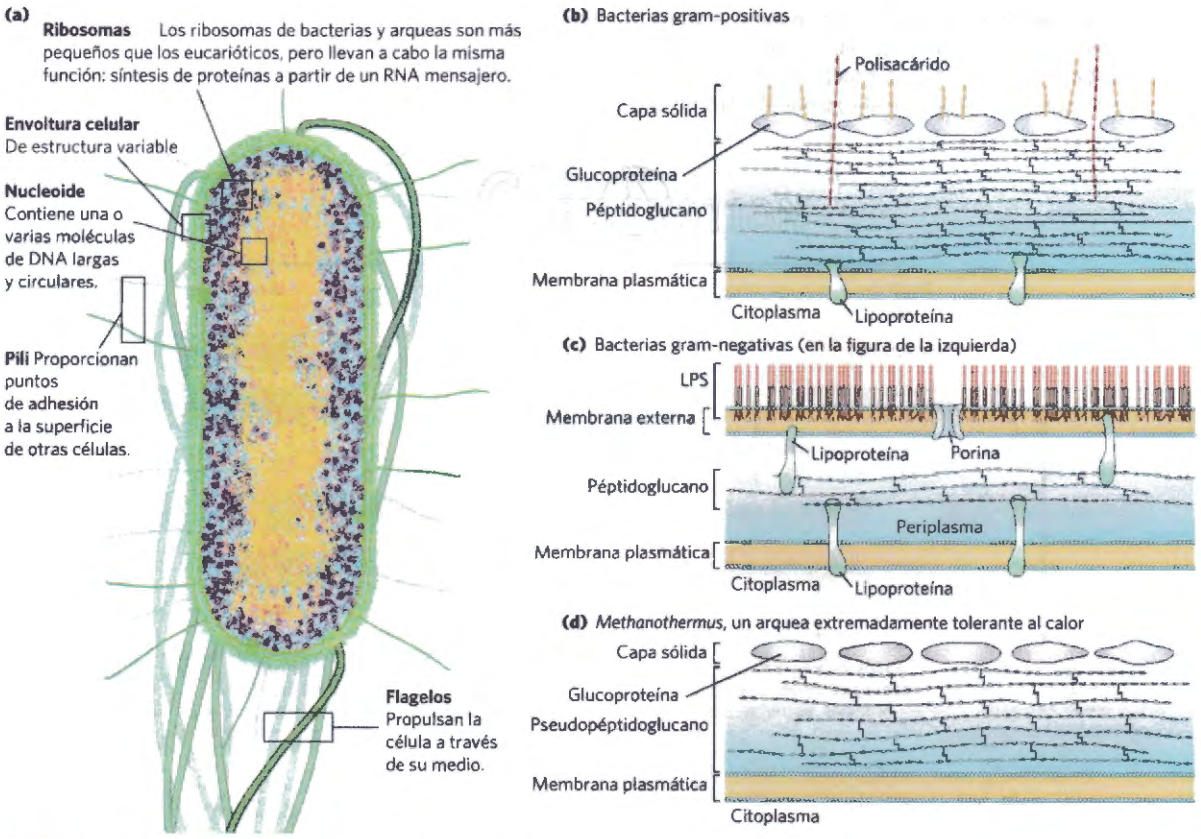


FIGURA 1-7 Algunas características estructurales comunes de células bacterianas y de arqueas. **(a)** Este dibujo a escala de *E. coli* sirve para ilustrar algunas características comunes. **(b)** La envoltura celular de las bacterias gram-positivas consta de una única membrana cubierta en su cara exterior por una gruesa y rígida capa de péptidoglucano. Diversos polisacáridos y otros polímeros complejos se entrelazan con el péptidoglucano y, rodeando todo el conjunto, se encuentra una "capa sólida" porosa compuesta por glucoproteínas. **(c)** *E. coli* es gram-negativa y tiene una doble membrana. Su membrana externa tiene lipopolisacáridos (LPS) en su cara exterior y fosfolípidos en la interior. Esta membrana externa está tachonada de canales proteicos (porinas) que permiten la difusión de moléculas pequeñas pero no de proteínas. La membrana interna (plasmática), constituida por fosfolípidos y proteínas, es impermeable tanto a moléculas grandes como pequeñas. Entre las membranas interna y externa, en el periplasma, se halla una fina capa de péptidoglucano que proporciona forma y rigidez a la célula pero que no retiene la tinción de Gram. **(d)** Las membranas de arqueas varían en estructura y composición, pero todas poseen una única membrana rodeada por una capa externa que puede contener una estructura parecida al péptidoglucano, una cubierta de proteínas porosas (capa sólida) o ambas. [Fuente: (a) David S. Goodsell. (b,c,d) Información de S.V. Albers y B.H. Meyer, *Nature Rev. Microbiol.* 9:414, 2011, Fig. 2.]

El citoplasma de *E. coli* contiene aproximadamente 15.000 ribosomas, cantidades variables (de decenas a miles) de copias de cada uno de los 1.000 o más enzimas diferentes, quizás unos 1.000 compuestos orgánicos de masa molecular inferior a 1.000 (metabolitos y cofactores) y diversidad de iones inorgánicos. El nucleoide contiene una única molécula circular de DNA y el citoplasma (al igual que ocurre en la mayoría de bacterias) contiene uno o más segmentos circulares de DNA de tamaño menor que reciben el nombre de **plásmidos**. En la naturaleza, algunos plásmidos confieren resistencia a toxinas y antibióticos presentes en el medio. En el laboratorio, estos segmentos de DNA son especialmente adecuados para la manipulación experimental y constituyen herramientas poderosas en ingeniería genética (véase el Capítulo 9).

Otras especies de bacterias, y también de arqueas, contienen una colección similar de biomoléculas, pero cada especie está especializada, física y metabólicamente, en relación con su nicho ambiental y sus fuentes de nutrición. Las cianobacterias, por ejemplo, poseen membranas internas especializadas en atrapar la energía de la luz solar (véase la Fig. 20-27). Muchas arqueas viven en ambientes muy especiales y han desarrollado adaptaciones bioquímicas para sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, presión o concentración salina. El estudio de las diferencias en la estructura del ribosoma proporcionó los primeros indicios de que Bacteria y Arquea constituyen dominios separados. La mayor parte de bacterias (incluida *E. Coli*) existen como células individuales, pero se asocian a menudo formando biofilms o tapices en los que un gran número de células se adhieren unas a otras y a algún sustrato sólido en una superficie acuosa o debajo de ella. Las células de algunas especies bacterianas (por ejemplo, las mixobacterias), muestran un primitivo comportamiento social, formando agregados compuestos por un gran número de células en respuesta a señales enviadas por células vecinas.

Las células eucarióticas poseen diversos orgánulos membranosos que pueden aislarse para su estudio

Las células eucarióticas típicas **(Fig. 1-8)** son mucho mayores que las bacterias (tienen normalmente un diámetro de 5 a 100 µm y un volumen celular que es entre mil y un millón de veces superior al de las bacterias. Las características distintivas de los eucariotas son el núcleo y los orgánulos rodeados de membrana que llevan a cabo funciones específicas. Entre estos orgánulos se incluyen las **mitocondrias**, donde tienen lugar la mayoría de las reacciones extractoras de energía de la célula; los **complejos** del **retículo endoplasmático** y de **Golgi**, que tienen un papel central en la síntesis y modificación de lípidos y proteínas de membrana; los **peroxisomas**, en los que se oxidan los ácidos grasos de cadena muy larga; y los **lisosomas**, llenos de enzimas digestivos que degradan los desechos celulares innecesarios. Las células vegetales contienen además **vacuolas** (que almacenan grandes cantidades de ácidos orgánicos) y **cloroplastos** (en los que la luz solar se aprovecha para la síntesis de ATP en la fotosíntesis) (Fig. 1-8). En el citoplasma de muchas células también se observan gránulos o gotículas que contienen nutrientes de reserva tales como almidón o grasas.

En lo que constituyó un importante avance bioquímico, Albert Claude, Christian de Duve y George Palade desarrollaron métodos para la separación de orgánulos citosólicos, un paso esencial para la investigación de su estructura y función. En un procedimiento de fraccionamiento celular típico **(Fig. 1-9)** se procede a disgregar células o tejidos en disolución mediante una homogeneización suave. Este tratamiento rompe la membrana celular pero respeta la integridad de la mayoría de los orgánulos. A continuación se centrifuga el homogenado, proceso en el que los orgánulos como el núcleo, las mitocondrias y los lisosomas sedimentan a velocidades diferentes a causa de su diferente tamaño.

Mediante estos métodos se demostró, por ejemplo, que los lisosomas contienen enzimas degradativos, que las mitocondrias contienen enzimas oxidativos y que los cloroplastos contienen pigmentos fotosintéticos. El aislamiento de un orgánulo enriquecido en un cierto enzima suele ser el primer paso en la purificación de dicho enzima.

El citoplasma se organiza gracias al citoesqueleto y es altamente dinámico

La microscopia de fluorescencia permite observar distintos tipos de filamentos de proteína que se entrecruzan en la célula eucariótica y forman una trama tridimensional interconectada, el **citoesqueleto**. Existen tres clases principales de filamentos citoplasmáticos –los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios **(Fig. 1-10)**, que difieren en anchura (entre 6 y 22 nm), composición y función específica. Todos ellos proporcionan estructura y organización al citoplasma y mantienen la forma de la célula. Los filamentos de actina y los microtúbulos colaboran también en el movimiento de los orgánulos o en el movimiento celular global.

Cada tipo de componente citoesquelético está compuesto por subunidades simples de proteína que se asocian de manera no covalente para formar filamentos de grosor uniforme. Estos filamentos no son estructuras permanentes, sino que se encuentran en constante fluctuación entre sus subunidades proteicas y los filamentos. Su localización celular no está fijada rígidamente, sino que varía mucho durante la mitosis, la citocinesis, el desplazamiento ameboideo o a causa de los cambios en la forma de la célula. La regulación de la formación, desagregación y localización de los diversos tipos de filamentos está regulada por otras proteínas encargadas de unir o entrelazar los filamentos o de desplazar orgánulos citoplasmáticos a lo largo de los mismos. (Las bacterias contienen proteínas parecidas a la actina que llevan a cabo funciones similares).

De este breve repaso de la estructura celular podemos extraer la idea general de que la célula eucariótica está formada por una trama de fibras estructurales y un complejo sistema de compartimentos limitados por membranas (Fig. 1-8). Los filamentos se desagregan para reestructurarse en otro lugar distinto. Las vesículas membranosas brotan de un orgánulo y se fusionan con otro. Los orgánulos se mueven por el citoplasma a lo largo de filamentos de proteína gracias a motores proteicos dependientes del consumo de energía. El **sistema endomembranoso** segrega procesos metabólicos específicos y aporta las superficies en las que tienen

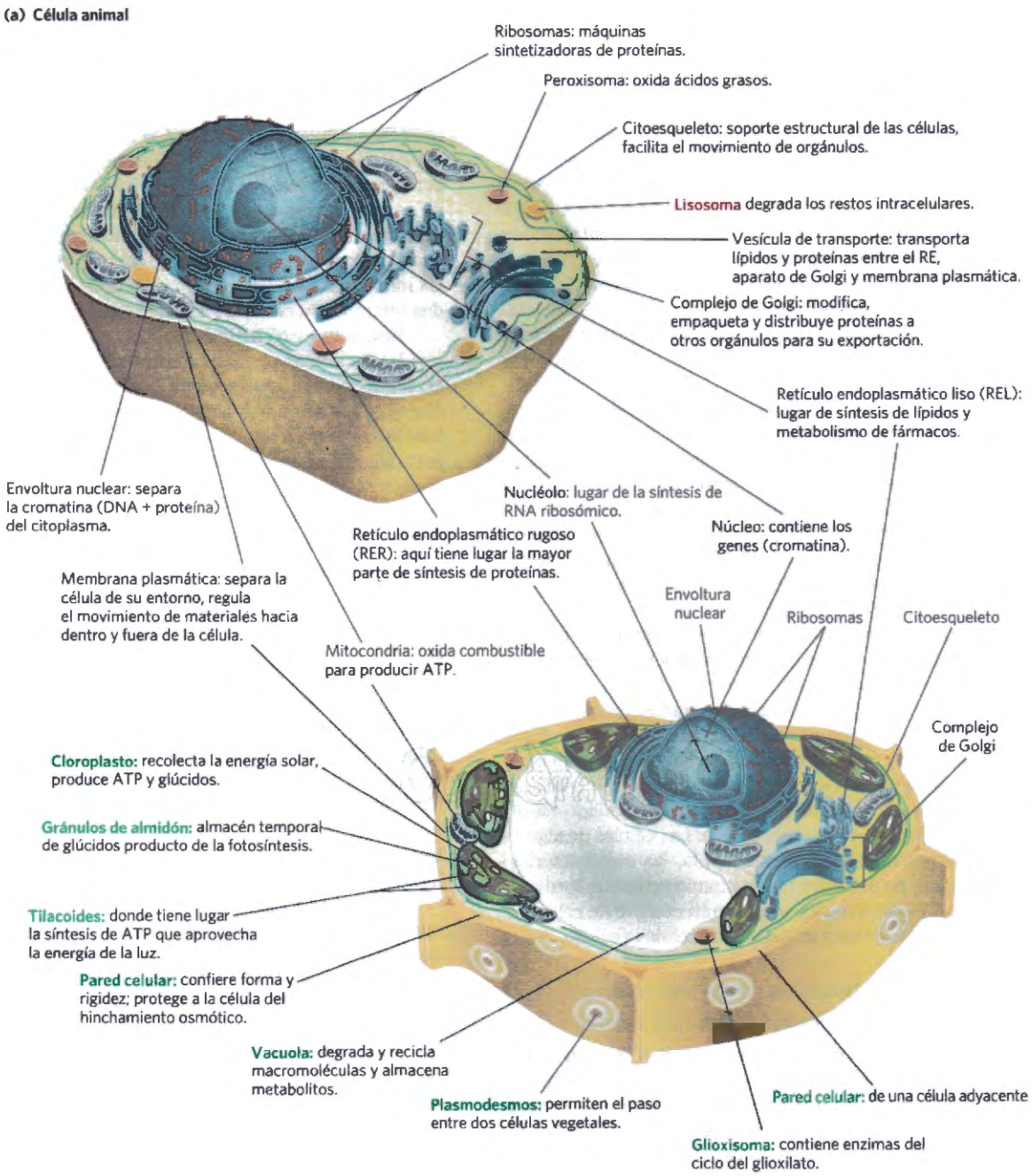


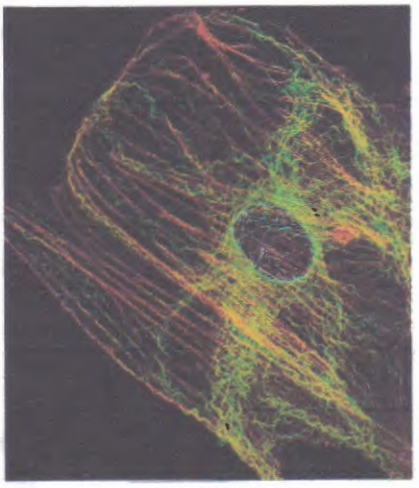
FIGURA 1-8 Estructura de la célula eucariótica. Ilustración esquemática de dos tipos principales de célula eucariótica: **(a)** una célula animal representativa y **(b)** una célula vegetal representativa. Las células vegetales tienen aproximadamente entre 10 y 100 μm de diámetro, mayores que las células animales que suelen tener un diámetro de entre 5 y 30 μm. Las estructuras rotuladas en rojo son exclusivas de células animales; las rotuladas en verde lo son de células vegetales. Los microorganismos eucarióticos (como protistas y hongos) tienen estructuras similares a las de las células animales y vegetales pero pueden contener también orgánulos especializados no ilustrados aquí.

lugar ciertas reacciones enzimáticas. La **exocitosis** y la **endocitosis**, mecanismos de transporte (hacia el exterior y el interior de las células, respectivamente) que implican fusión y fisión de membranas, permiten la comunicación entre el citoplasma y su medio externo mediante la secreción de sustancias producidas en la célula y la captación de material extracelular.

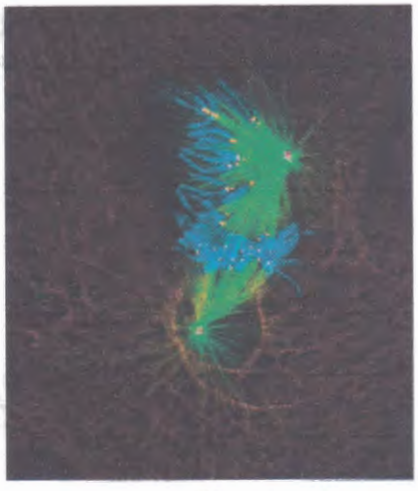
Esta organización estructural del citoplasma está lejos de ser producto del azar. El movimiento y la posición de los orgánulos y de los elementos del citoesqueleto están sometidos a una estrecha regulación y en el transcurso de la vida de la célula se producen importantes reorganizaciones finamente orquestadas, como la mitosis. Las interacciones entre citoesqueleto y orgánulos son reversibles, de tipo no covalente y están sujetas a regulación en respuesta a diversas señales intra y extracelulares.



FIGURA 1-9 Fraccionamiento subcelular de un tejido. En primer lugar se homogeniza mecánicamente un tejido, como por ejemplo el hígado, para romper las células y dispersar su contenido en un medio acuoso tamponado. El medio de sacarosa que tiene una presión osmótica similar a la de los orgánulos, equilibra la difusión de agua hacia fuera y hacia el interior de los orgánulos, ya que éstos se hincharían y romperían en una disolución de menor osmolaridad (véase la Fig. 2-13). Las partículas en suspensión de diferentes tamaños se pueden separar por centrifugación a diferentes velocidades. Las partículas más grandes sedimentan más rápidamente que las más pequeñas y el material soluble no sedimenta. Mediante una cuidadosa elección de las condiciones de la centrifugación es posible separar las fracciones subcelulares para su caracterización bioquímica. [Fuente: Información de B. Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed. Garland Publishing, Inc., 1989, p.165.]



(a)



(b)

FIGURA 1-10 Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Se pueden marcar estructuras celulares con un anticuerpo (capaz de reconocer una proteína específica) unido covalentemente a un compuesto fluorescente. Las estructuras teñidas son visibles cuando se observa la célula con un microscopio de fluorescencia. **(a)** En esta célula de fibroblasto en cultivo los haces filamentos de actina están teñidos en rojo; los microtúbulos, que irradian desde el centro de la célula, en verde; y los cromosomas del núcleo en azul. **(b)** Una célula pulmonar de tritón durante la mitosis. Los microtúbulos (verde), unidos a estructuras llamadas cinetocoros (amarillo) sobre los cromosomas condensados (azul), arrastran a los cromosomas hacia los polos opuestos, o centrosomas (magenta) de la célula. Los filamentos intermedios, formados por queratina (rojo), mantienen la estructura de la célula. [Fuentes: (a) James J. Faust y David G. Capco, Arizona State University/NIH National Institute of General Medical Sciences. (b) Dr. Alexey Khodjakov, Wadsworth Center, New York State Department of Health.]

Las células construyen estructuras supramoleculares

Las macromoléculas y sus subunidades monoméricas son de tamaño muy diferente **(Fig. 1-11)**. Una molécula de alanina mide menos de 0,5 nm. Una molécula de hemoglobina, proteína transportadora de oxígeno en los eritrocitos (células rojas de la sangre), contiene cerca de 600 subunidades de aminoácido formando cuatro largas cadenas que se pliegan de forma globular y se asocian en estructuras de 5,5 nm de diámetro. Las proteínas son, a su vez, mucho menores que los ribosomas (cuyo diámetro es de aproximadamente 20 nm), orgánulos de tamaño muy inferior al de las mitocondrias que miden aproximadamente 1.000 nm de diámetro. Existe, pues, una gran diferencia entre las biomoléculas simples y las estructuras que pueden observarse al microscopio óptico. La **Figura 1-12** ilustra la jerarquía estructural en la organización celular.

Las subunidades monoméricas de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos se unen mediante enlaces cova-

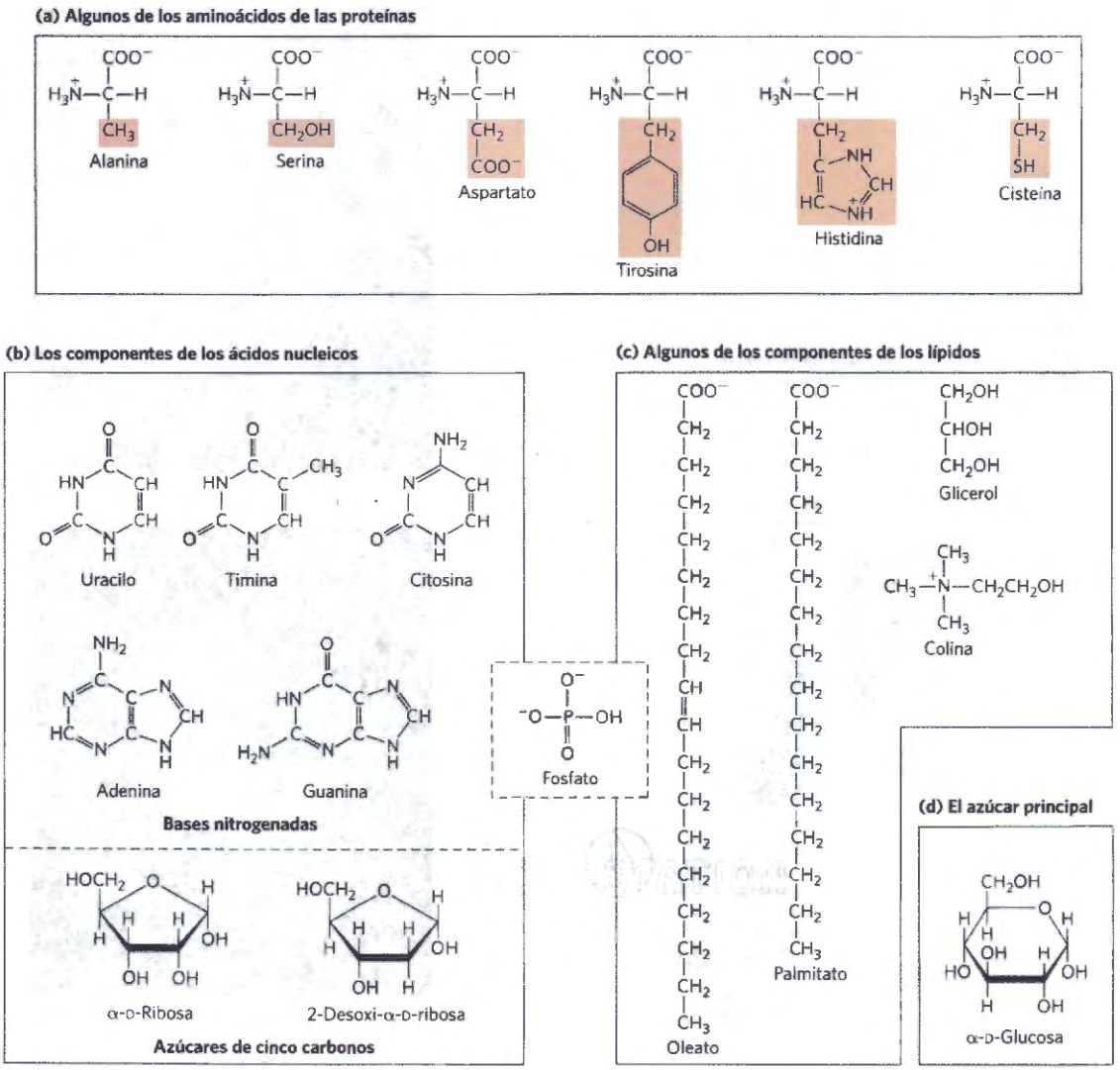


FIGURA 1-11 Compuestos orgánicos a partir de los cuales se forman la mayoría de los componentes celulares: el ABC de la Bioquímica. (a) Seis de los veinte aminoácidos a partir de los cuales se construyen todas las proteínas (las cadenas laterales se destacan en rosa); **(b)** las cinco bases nitrogenadas, dos azúcares de cinco carbonos y el ácido fosfórico a partir de los cuales se construyen todos los ácidos nucleicos; **(c)** cinco componentes de membranas lipídicas, y **(d)** D-glucosa, el azúcar sencillo a partir del cual se derivan la mayor parte de los glúcidos. Nótese que el fosfato es un componente tanto de los ácidos nucleicos como de las membranas lipídicas.

lentes. Sin embargo, en complejos supramoleculares, las macromoléculas se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes mucho más débiles, individualmente, que los enlaces covalentes. Entre las interacciones no covalentes se cuentan los enlaces de hidrógeno (entre grupos polares), las interacciones iónicas (entre grupos cargados), las interacciones hidrofóbicas (entre grupos no polares en disolución acuosa) y las interacciones de van der Waals (fuerzas de London), todas ellas de energía considerablemente menor que la de los enlaces covalentes. Las interacciones no covalentes se describen en el Capítulo 2. Los complejos supramoleculares se estabilizan gracias al gran número de interacciones no covalentes que se establecen en ellos y que son las responsables de sus estructuras únicas.

Los estudios in vitro podrían no detectar interacciones importantes entre moléculas

Uno de los métodos para entender un proceso biológico consiste en el estudio de las moléculas purificadas in vitro (en el interior del tubo de ensayo), sin interferencias con otras moléculas presentes en la célula intacta (es decir, in vivo). A pesar de que esta metodología ha resultado muy útil, debemos recordar que el interior de una célula es muy diferente del entorno que pueda haber en un tubo de ensayo. Los componentes que "interfieren" y que se eliminan mediante purificación pueden resultar críticos para la función biológica o para la regulación de la actividad de la molécula purificada. Por ejemplo, los estudios in vitro de enzimas purificados se llevan a cabo normalmente a concentraciones de enzima muy bajas y en disoluciones acuosas en agitación constante. En la célula, el enzima se encuentra disuelto o suspendido en un citosol de textura parecida

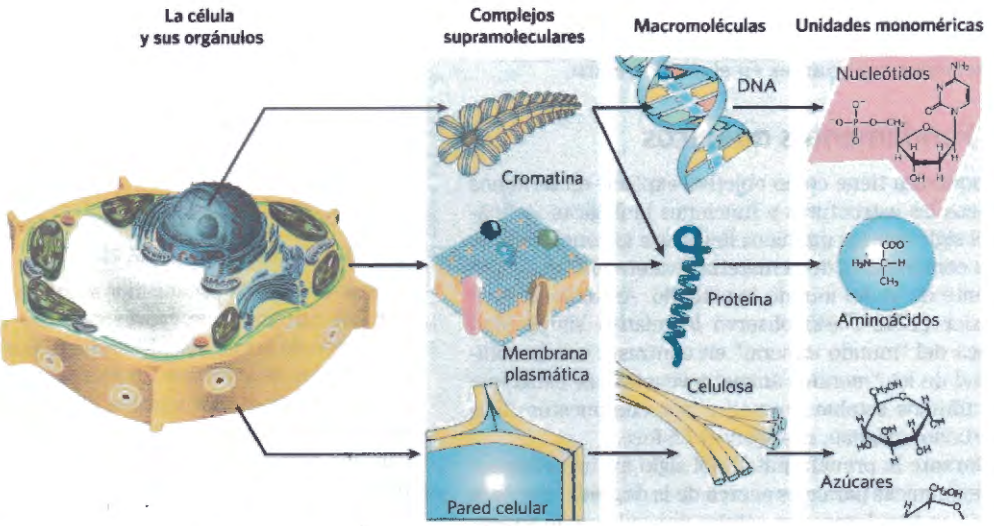


FIGURA 1-12 Jerarquía estructural en la organización molecular de las células. Los orgánulos y otros componentes relativamente grandes de las células están compuestos por complejos supramoleculares que, a su vez, están compuestos por macromoléculas más pequeñas e incluso subunidades moleculares aún más pequeñas. Por ejemplo, el núcleo de esta célula vegetal contiene la cromatina, un complejo supramolecular formado por DNA y proteínas básicas (histonas). El DNA está compuesto por subunidades monoméricas simples (nucleótidos), de la misma manera que las proteínas están formadas por aminoácidos. [Fuente: Información de W.M. Becker y D.W. Deamer, *The World of the Cell*, 2ª ed., Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991, Fig. 2-15.]

a un gel y acompañado de miles de proteínas diferentes, algunas de las cuales se unen al enzima y modifican su actividad. Algunos enzimas forman parte de complejos multienzimáticos en los que los reactivos son canalizados de un enzima a otro sin que lleguen a tener contacto con el disolvente. Si se representan todas las macromoléculas conocidas de una célula a sus dimensiones y concentraciones reales **(Fig. 1-13)**, resulta evidente la gran densidad del citosol y que la difusión de macromoléculas en su interior debe estar ralentizada por la colisión con otras estructuras grandes. Resumiendo, una molécula determinada puede actuar de modo muy diferente en la célula que in vitro. Uno de los retos de la bioquímica consiste en comprender la influencia de la organización celular y las asociaciones macromoleculares en la función de enzimas y otras biomoléculas, es decir, comprender la función tanto in vivo como in vitro.

RESUMEN 1.1 Fundamentos celulares

- Todas las células están rodeadas por una membrana plasmática, poseen un citosol que contiene metabolitos, coenzimas, iones inorgánicos y enzimas y poseen un conjunto de genes contenidos en un nucleoide (bacterias y arqueas) o un núcleo (eucariotas).
- Todos los organismos necesitan una fuente de energía para desarrollar trabajo celular. Los fotótrofos obtienen energía de la luz del sol; los quimiótrofos oxidan combustibles mediante la transferencia de electrones a buenos aceptores electrónicos: compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos u oxígeno molecular.
- Las células bacterianas y de arqueas contienen un citosol, un nucleoide y plásmidos, todos ellos dentro de una envoltura celular. Las células eucarióticas tienen núcleo y están multicompartimentadas, con ciertos procesos confinados en orgánulos específicos; estos orgánulos se pueden separar para su estudio de modo aislado.
- Las proteínas del citoesqueleto se unen formando largos filamentos que confieren forma y rigidez a las células y son el soporte para el movimiento de los orgánulos a través de la célula.
- Los complejos supramoleculares que se mantienen unidos mediante interacciones no covalentes forman parte de una jerarquía estructural, algunos de cuyos componentes son visibles al microscopio óptico. La eli-

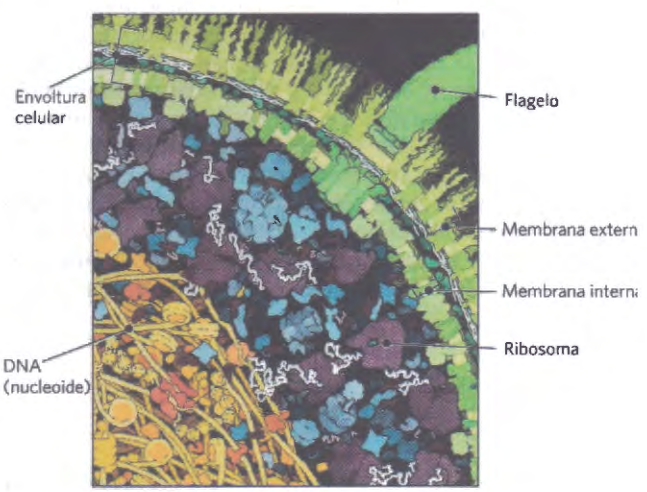


FIGURA 1-13 La célula abarrotada. Este dibujo de David Goodsell representa de manera muy exacta los tamaños y cantidades relativas de las macromoléculas en una pequeña región de una célula de *E. coli*. Este citosol concentrado y abarrotado de proteínas y ácidos nucleicos es muy diferente del típico extracto celular utilizado en estudios bioquímicos, en los que el citosol ha sido diluido muchas veces, alterando en gran medida las interacciones entre las macromoléculas que se difunden en él. [Fuente: © David. S. Goodsell, 1999.]

minación de moléculas individuales de estos complejos para su estudio in vitro puede provocar la pérdida de interacciones importantes en el medio celular.

1.2 Fundamentos químicos

La bioquímica tiene como objetivo explicar en términos químicos las estructuras y funciones biológicas. A finales del siglo XVIII los químicos llegaros a la conclusión de que la composición de la materia viva era notablemente diferente de la del mundo inanimado. Antoine-Laurent Lavoisier (1743-1794) observó la relativa simplicidad química del "mundo mineral" en contraste con la complejidad de los "mundos animal y vegetal"; se sabía que estos últimos estaban formados por compuestos ricos en carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo.

Durante la primera mitad del siglo XX, investigaciones bioquímicas paralelas acerca de la degradación de la glucosa en levaduras y en células musculares de animales permitieron observar importantes similitudes químicas en estos dos tipos de células, aparentemente muy diferentes: la degradación de la glucosa en la levadura y en células musculares tiene lugar a través de los mismos 10 intermediarios químicos y los mismos 10 enzimas. Estudios posteriores sobre muchos otros procesos bioquímicos en un gran número de organismos diferentes confirmó la universalidad de esta observación, claramente resumida por Jacques Monod en 1954: "Lo que es cierto para *E. coli* es cierto para el elefante". La noción actual de que todos los organismos comparten un origen evolutivo común se basa en parte en esta universalidad de intermediarios y transformaciones químicas, frecuentemente denominada "unidad bioquímica".

Menos de 30 de los más de 90 elementos químicos presentes en la naturaleza son esenciales para los seres vivos. La mayoría de los elementos de la materia viva tienen un número atómico relativamente bajo; sólo tres de ellos tienen número atómico superior al del selenio, 34 **(Fig. 1-14)**. Los cuatro elementos más abundantes en los organismos vivos, en términos de porcentaje sobre el número total de átomos, son el hidrógeno, el oxígeno, el nitrógeno y el carbono, que en conjunto representan más del 99% de la masa de la mayoría de las células. Son los elementos más ligeros capaces de formar uno, dos, tres y cuatro enlaces covalentes, respectivamente; en general, los elementos más ligeros forman los enlaces más fuertes. Los oligoelementos (Fig. 1-13) representan una fracción minúscula del peso del cuerpo humano pero todos ellos son esenciales para la vida, generalmente a causa de que resultan imprescindibles para la función de proteínas específicas, incluidos muchos enzimas. La capacidad transportadora de oxígeno de la molécula de hemoglobina, por ejemplo, depende totalmente de cuatro iones de hierro que constituyen sólo el 0,3% de su masa.

Las biomoléculas son compuestos de carbono con diversos grupos funcionales

La química de los organismos vivos se organiza alrededor del carbono, que representa más de la mitad del peso seco de las células. El carbono puede formar enlaces simples con átomos de hidrógeno, y tanto enlaces simples como dobles con los átomos de oxígeno y de nitrógeno **(Fig. 1-15)**. La capacidad de los átomos de carbono para formar enlaces simples muy estables con hasta otros cuatro átomos de carbono es de gran trascendencia en biología. Dos átomos de carbono pueden compartir también dos (o tres) pares de electrones, formando enlaces dobles (o triples).

Los cuatro enlaces simples que puede formar un átomo de carbono se distribuyen desde el núcleo a los cuatro vértices de un tetraedro **(Fig. 1-16)**, con un ángulo de 109,5° entre ellos y una longitud media de enlace de 0,154 nm. Existe libertad de rotación alrededor de cada enlace simple carbono-carbono a no ser que ambos átomos de carbono estén unidos a grupos muy voluminosos o cargados, en cuyo caso la rotación puede estar restringida. Un enlace doble carbono-carbono es más corto (mide aproximadamente 0,134 nm) y rígido, y sólo permite una rotación muy limitada alrededor de su eje.

Los átomos de carbono enlazados covalentemente en las biomoléculas pueden formar cadenas lineares, ramificadas y estructuras circulares. Es probable que la versatilidad de enlace del carbono, consigo mismo y con otros elementos, fuera una de las causas principales de la selección de los compuestos de carbono para formar parte de la maquinaria molecular de las células durante el origen y la evolución de los seres vivos. Ningún otro elemento químico puede formar moléculas de tamaños, formas y composición tan diferentes.

Puede considerarse que la mayor parte de las biomoléculas son derivados de los hidrocarburos, con los átomos de hidrógeno reemplazados por una amplia gama de grupos funcionales que confieren propiedades químicas específicas a la molécula y dan lugar a las diferentes familias de compuestos orgánicos. Las familias

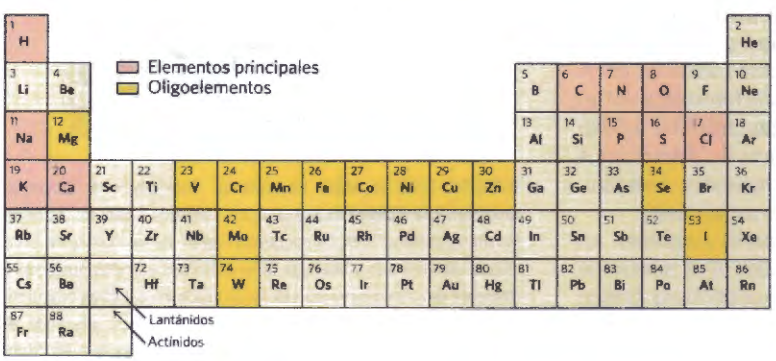


FIGURA 1-14 Los elementos esenciales para la vida y la salud de los animales. Los elementos principales (sobre fondo rojo claro) son componentes estructurales de células y tejidos y deben estar presentes en la dieta en cantidades diarias del orden de gramos. Las necesidades de oligoelementos (sobre fondo amarillo) son mucho menores: en el caso del hombre son suficientes unos pocos miligramos al día de Fe, Cu, y Zn, y todavía menos de los demás elementos. Las necesidades elementales de las plantas y los microorganismos son muy similares a las aquí presentadas; son variadas las formas en que adquieren estos elementos.

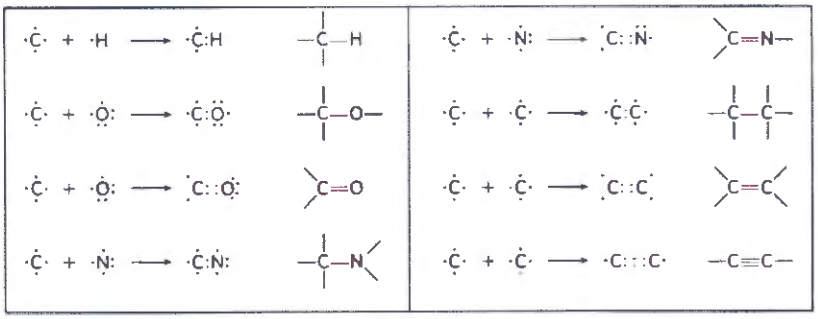


FIGURA 1-15 Versatilidad de enlace del carbono. El carbono puede formar enlaces covalentes simples, dobles y triples (todos los enlaces en rojo), en especial con otros átomos de carbono. Los enlaces triples son muy poco frecuentes en las biomoléculas.

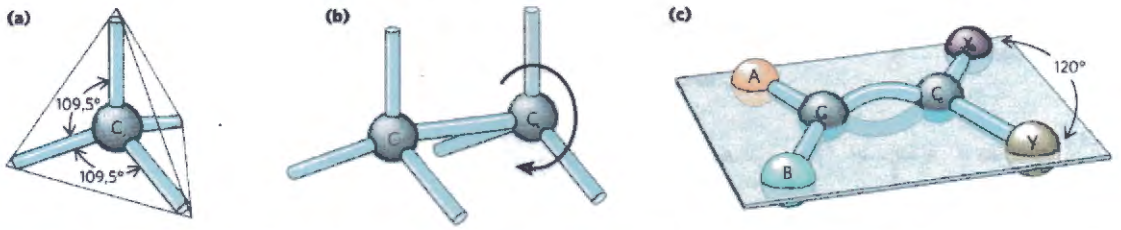


FIGURA 1-16 Geometría de los enlaces del carbono. **(a)** Los átomos de carbono presentan la distribución tetraédrica característica de sus cuatro enlaces simples. **(b)** Los enlaces simples carbono-carbono presentan libertad de rotación, como se muestra aquí para el etano (CH_3-CH_3). **(c)** Los enlaces dobles son más cortos y no permiten la libre rotación. Los dos carbonos unidos por el enlace doble y los átomos denominados A, B, X e Y están situados en el mismo plano rígido.

más comunes de compuestos orgánicos son los alcoholes, con uno o más grupos hidroxilo, las aminas, con grupos amino, los aldehídos y las cetonas, con grupos carbonilo; y los ácidos carboxílicos, con grupos carboxilo **(Fig. 1-17)**. Muchas biomoléculas son polifuncionales y contienen dos o más tipos de grupos funcionales **(Fig. 1-18)**, cada uno de ellos con propiedades químicas y reactividad propias. La "personalidad" química de cada compuesto viene determinada por la química de sus grupos funcionales y su disposición en el espacio tridimensional.

Las células contienen un conjunto universal de moléculas pequeñas

En la fase acuosa de una célula (citosol) se encuentra disuelta una colección de quizás un millar de pequeñas moléculas orgánicas diferentes (M_r ~100 a ~500), cuyas concentraciones intracelulares oscilan entre nanomolar y milimolar (vea la Fig. 15-4). (En el Recuadro 1-1 se encuentra una explicación de las diversas maneras de referirnos al peso molecular). Estos son los metabolitos centrales de las rutas principales presentes en la práctica totalidad de las células: los metabolitos y

RECUADRO 1–1 Peso molecular, masa molecular y las unidades que deben utilizarse

Existen dos maneras comunes y equivalentes para definir la masa molecular y ambas se utilizan en este texto. La primera es el *peso molecular*, o *masa molecular relativa*, representados por el símbolo M_r. El peso molecular de una sustancia se define como la relación entre la masa de una molécula de esta sustancia y la duodécima parte de la masa del carbono-12 (^{12}C). Al definirse como una relación entre dos valores con las mismas unidades, M_r no tiene dimensiones, es decir, no tiene unidades asociadas. La segunda es la *masa molecular*, representada por m. Ésta es simplemente la masa de una molécula, o la masa molecular dividida por el número de Avogadro. La masa molecular, m, se expresa en daltons (abreviado Da). Un dalton equivale a una duodécima parte de la masa del carbono-12; un kilodalton (kDa) equivale a 1.000 daltons y un megadalton (MDa) a un millón de daltons.

Considérese, por ejemplo, una molécula de masa 1.000 veces la del agua. De esta molécula podemos decir lo siguiente: M_r = 18.000 o m = 18.000 daltons. También la podemos describir como "una molécula de 18 kDa". Sin embargo, la expresión M_r = 18.000 daltons es incorrecta.

Otra unidad conveniente que sirve para describir la masa de un único átomo o una única molécula es la unidad de masa atómica (anteriormente denominada uma, abreviatura que ahora ha sido cambiada por u). Una unidad de masa atómica (1 u) se define como la duodécima parte de la masa de un átomo de carbono-12. Puesto que la masa de un átomo de carbono-12 medida experimentalmente es de $1{,}9926 \times 10^{-23}$ g, 1 u = $1{,}6606 \times 10^{-24}$ g. La unidad de masa atómica resulta adecuada para describir, por ejemplo, la masa de un pico observado por espectrometría de masas (consulte el Capítulo 3, p. 100).

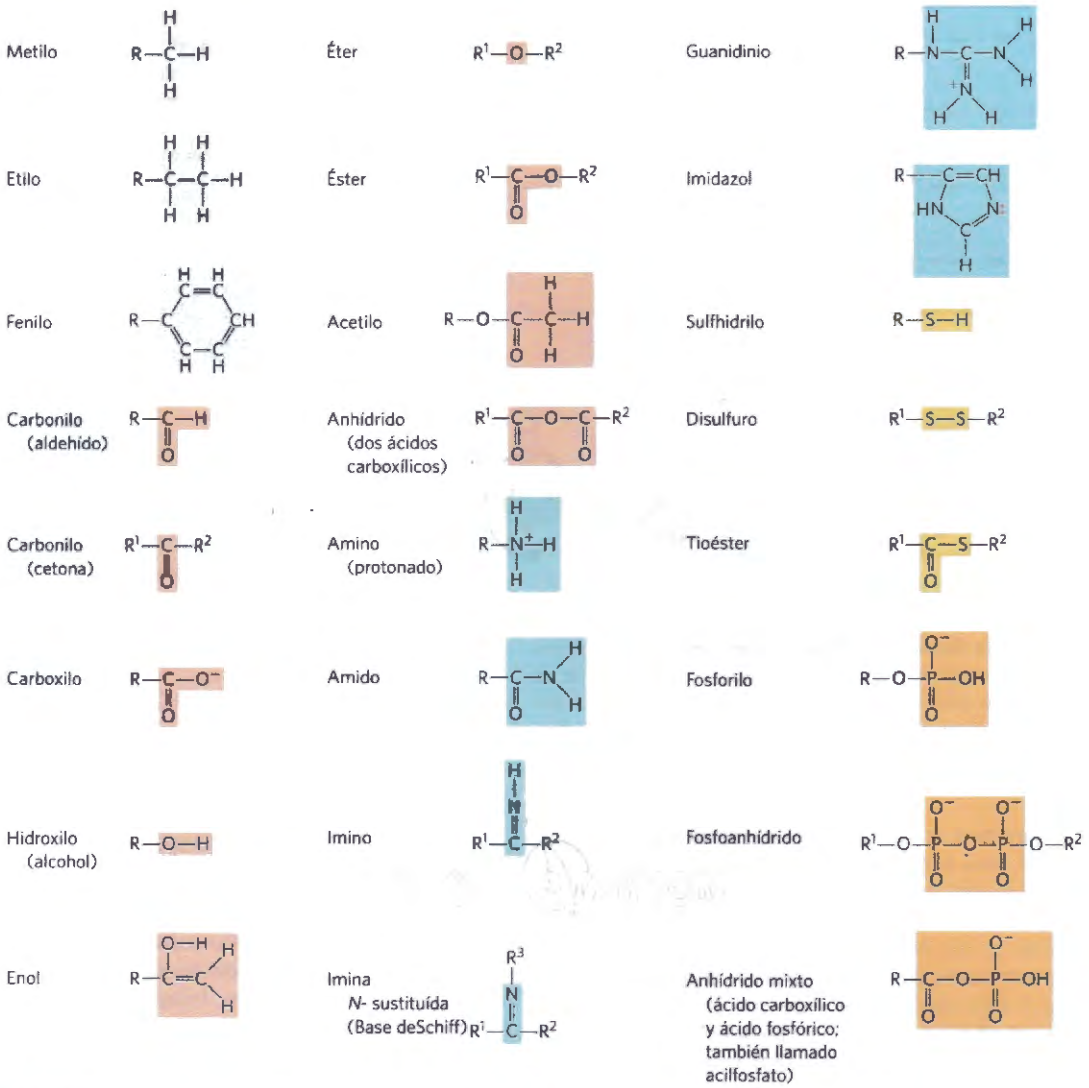


FIGURA 1-17 Algunos grupos funcionales comunes en biomoléculas. Los grupos funcionales se representan con un fondo del color usado normalmente para representar el elemento que los caracteriza: gris para el C, rojo para el O, azul para el N, amarillo para el S y naranja para el P. En esta figura y en todo el libro, se utiliza la R para representar un "sustituyente cualquiera". Puede ser tan simple como un átomo de hidrógeno, pero normalmente es un grupo que contiene carbono. Cuando se representan dos o más sustituyentes en una molécula se emplea el superíndice R^1, R^2, etc.

rutas que se han conservado a lo largo de la evolución. En este conjunto de moléculas se incluyen los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y sus derivados fosforilados y ciertos ácidos mono- di- y tricarboxílicos. Las moléculas pueden ser polares o cargadas y solubles en agua. Están atrapadas dentro de la célula porque la membrana plasmática es impermeable a ellas, aunque algunos transportadores de membrana específicos pueden catalizar el movimiento de ciertas moléculas hacia el interior o el exterior de la célula o entre compartimientos de las células eucarióticas. La presencia universal del mismo conjunto de compuestos en las células vivas es una manifestación de la conservación evolutiva de las rutas metabólicas que se desarrollaron en las células primitivas.

Existen otras biomoléculas pequeñas que son específicas para ciertos tipos de células u organismos. Por ejemplo, las plantas vasculares contienen, además de los metabolitos ya comentados de carácter universal, otras moléculas pequeñas denominadas **metabolitos secundarios**, que juegan un papel específico en la vida de la planta. Entre estos metabolitos se incluyen compuestos que proporcionan su aroma y color característicos a las plantas y otros como la morfina, quinina, nicotina y cafeína, apreciados por sus efectos fisiológicos en humanos pero que desempeñan otras funciones en las plantas.

El conjunto de moléculas pequeñas de una célula determinada en unas condiciones específicas se denomina **metaboloma**, estableciendo un paralelismo con el término "genoma". La **metabolómica** es la caracterización sistemática del metaboloma en condiciones muy específicas (como por ejemplo después de la administración de un fármaco o de una señal biológica como la insulina).

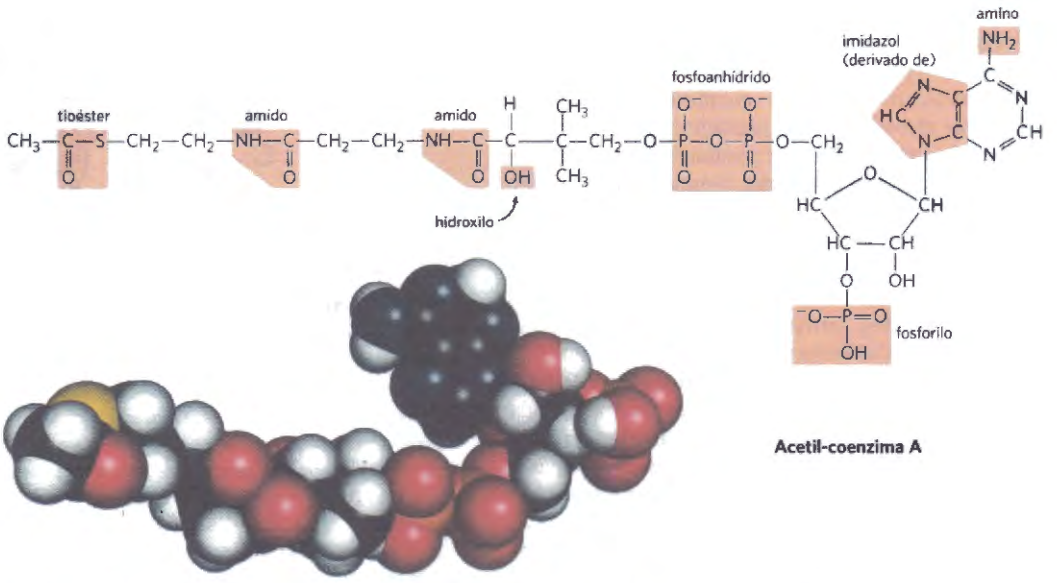


FIGURA 1-18 Varios grupos funcionales comunes en una única biomolécula. El acetil-coenzima A (comúnmente abreviado acetil-CoA) es un portador de grupos acetilo en algunas reacciones enzimáticas. Los grupos funcionales se identifican en la fórmula estructural. Como veremos en el Capítulo 2, varios de estos grupos funcionales pueden existir en su forma protonada o desprotonada, en función del pH. En el modelo espacial, N es azul, C es negro, P es naranja, O es rojo y H es blanco. El átomo amarillo de la izquierda es el azufre del importante enlace tioéster que se forma entre el acetilo y el coenzima A. [Fuente: La estructura del Acetil-CoA se ha obtenido de PDB ID 1DM3, Y. Modis y R.K. Wierenga, *J. Mol. Biol.* 297:1171, 2000.]

Las macromoléculas son los principales constituyentes de las células

Muchas moléculas biológicas son **macromoléculas**, polímeros de masa molecular superior a ~5.000 construidos a partir de precursores relativamente simples. Los polímeros más cortos se denominan **oligómeros** (del griego *oligos*, "pocos"). Las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos son macromoléculas compuestas por monómeros de masa molecular igual o inferior a 500. La síntesis de macromoléculas es una de las actividades celulares que más energía consume. Las macromoléculas pueden unirse entre ellas para dar lugar a complejos supramoleculares que dan lugar a unidades funcionales tales como los ribosomas. En la Tabla 1-1 se muestran las principales clases de biomoléculas en una célula de *E. coli*.

Las **proteínas**, largos polímeros de aminoácidos, constituyen, junto con el agua, la fracción celular más importante. Algunas proteínas tienen propiedades catalíticas y actúan como enzimas, otras sirven como elementos estructurales, receptores de señales o transportadores que acarrean sustancias específicas hacia o desde el interior de las células. Las proteínas son quizás las biomoléculas más versátiles de todas las biomoléculas y el catálogo de sus muchas funciones resultaría muy largo. La suma de todas las proteínas que funcionan en una célula son su **proteoma**, y la **proteómica** es la caracterización sistemática de este complemento de proteínas en unas condiciones determinadas. Los **ácidos nucleicos**, DNA y RNA, son polímeros de nucleótidos. Almacenan y transmiten la información genética, y algunas moléculas de RNA desempeñan papeles estructurales y catalíticos en complejos supramoleculares. El **genoma** es la secuencia completa del DNA de una célula (o en el caso de los virus de RNA, su RNA), y la **genómica** es la caracterización de la estructura comparativa, la función, la evolución y el mapeado de los genomas. Los **polisacáridos**, polímeros de azúcares sencillos tales como la glucosa, tienen tres funciones principales: como almacén de combustibles energéticos, como componentes estructurales rígidos de las paredes celulares (en plantas y bacterias) y como elementos de reconocimiento extracelular que se unen a proteínas de otras células. Los polímeros más cortos de azúcares (oligosacáridos) unidos a proteínas o lípidos de la superficie celular actúan como señales celulares especí-

TABLA 1-1 Componentes moleculares de una célula de *E. coli*

	Porcentaje de peso total de la célula	Número aproximado de especies moleculares diferentes
Agua	70	1
Proteínas	15	3.000
Ácidos nucleicos		
DNA	1	1–4
RNA	6	>3.000
Polisacáridos	3	20
Lípidos	2	50[a]
Subunidades monoméricas e intermediarios	2	2.600
Iones inorgánicos	1	20

Fuente: A.G. Guo et al., *Nucleic Acids Res*, 41:D625, 2013.

[a] Este número sería muy superior si se consideraran todas las permutaciones y combinaciones de ácidos grasos sustituyentes.

ficas. El **glicoma** de una célula es el conjunto de sus moléculas que contienen glúcidos. Los **lípidos**, derivados insolubles de hidrocarburos, actúan como componentes estructurales de las membranas, reserva de combustible rico en energía, pigmentos y señales intracelulares. Las moléculas que contienen lípidos en una célula constituyen su **lipidoma**. Gracias a la aplicación de métodos sensibles y de gran poder resolutivo (como por ejemplo la espectrometría de masas) es posible distinguir y cuantificar cientos o miles de estos componentes y cuantificar, por consiguiente, sus variaciones en respuesta a señales, fármacos o condiciones cambiantes. La biología de sistemas trata de integrar la información procedente de la genómica, la proteómica, la glicómica y la lipidómica para obtener una visión molecular de todas las actividades de una célula en unas condiciones determinadas y de los cambios que ocurren cuando el sistema es perturbado por señales o circunstancias externas o a causa de mutaciones.

Proteínas, polinucleótidos y polisacáridos están formadas por un gran número de subunidades monoméricas y tienen por tanto masas moleculares elevadas: entre 5.000 y más de 1 millón en proteínas, hasta varios miles de millones en ácidos nucleicos y del orden de millones en polisacáridos tales como el almidón. Las moléculas individuales de lípido son mucho más pequeñas (M_r 750 a 1.500) y no se consideran macromoléculas. Sin embargo, pueden formar estructuras muy grandes por asociación no covalente. Las membranas celulares se construyen a partir de enormes agregados no covalentes de moléculas de lípidos y de proteínas.

Dadas sus secuencias características construidas con subunidades y ricas en información, se suele definir a las proteínas y a los ácidos nucleicos como **macromoléculas informativas**. Como se ha dicho antes, algunos oligosacáridos actúan también como moléculas informativas.

La estructura tridimensional se describe en términos de configuración y conformación

Los enlaces covalentes y los grupos funcionales de las biomoléculas son de importancia central para su función, del mismo modo que resulta de crucial importancia la distribución de los átomos de una biomolécula en el espacio tridimensional (su estereoquímica). Los compuestos de carbono existen normalmente como **estereoisómeros**, moléculas que contienen los mismos enlaces químicos y la misma fórmula química pero con diferente **configuración** o distribución espacial de sus átomos constituyentes. Las interacciones entre las biomoléculas son invariablemente **estereoespecíficas**, lo que implica que las moléculas que interactúan tienen una configuración específica.

La **Figura 1-19** muestra tres formas de ilustrar la estereoquímica, o configuración, de moléculas simples. El diagrama en perspectiva especifica la estereoquímica de forma no ambigua, pero los ángulos y las distancias de enlace se representan mejor con modelos de bolas y varillas. En los modelos espacialmente llenos el radio de cada átomo es proporcional a su radio de van der Waals y los contornos del modelo definen el espacio ocupado por la molécula (el volumen del que quedan excluidos los átomos de otras moléculas).

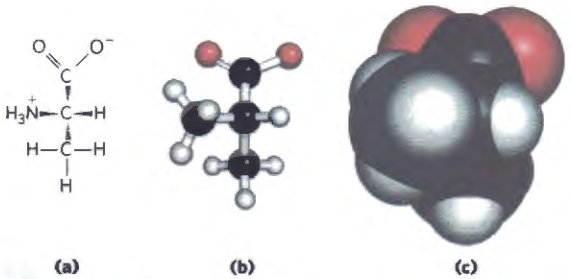
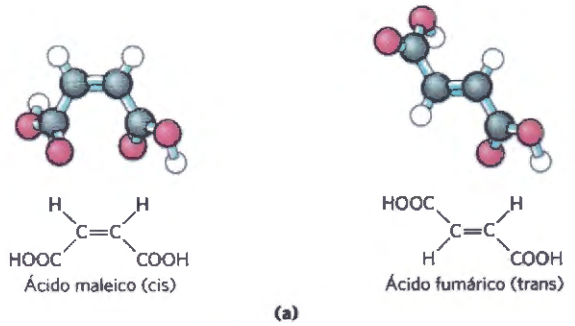


FIGURA 1-19 Representación de moléculas. Tres maneras de representar la estructura del aminoácido alanina (aquí se muestra en su forma iónica a pH neutro). **(a)** Fórmula estructural en perspectiva: el símbolo en forma de cuña (▬) representa un enlace en el que el átomo del extremo más ancho se proyecta hacia el exterior del plano del papel y hacia el lector; el símbolo en forma de cuña a trazos (▬) representa enlaces que están dirigidos hacia la parte posterior al plano del papel. **(b)** Modelo de bolas y varillas, donde se observan las longitudes relativas de los enlaces y los ángulos de enlace. **(c)** Modelo espacial lleno, en el que cada átomo se presenta con su radio de van der Waals relativo correcto.

La configuración es el resultado de la presencia de (1) enlaces dobles, alrededor de los cuales existe poca o nula libertad de rotación, o (2) centros quirales, alrededor de los cuales los grupos sustituyentes se disponen según una orientación específica. La característica que identifica a los estereoisómeros es que no pueden ser interconvertidos sin romper temporalmente uno o más enlaces covalentes. La **Figura 1-20a** muestra las configuraciones del ácido maleico y de su isómero, el ácido fumárico. Estos compuestos son **isómeros geométricos** o **isómeros cis-trans**; difieren en la disposición de sus grupos sustituyentes con respecto al doble enlace que no posee capacidad de rotación (del latín *cis*, "a este lado" –los grupos se encuentran en el mismo lado del enlace doble; *trans*, "al otro lado" –los grupos se hallan en lados opuestos). El ácido maleico (maleato en el pH neutro del citoplasma) es el isómero cis y el ácido fumárico (fumarato) es el trans; cada uno de ellos es un compuesto bien definido que puede ser aislado y purificado y que tiene sus propias características químicas. Un lugar de unión (por ejemplo, en un enzima) que sea complementario con una de estas moléculas no lo será para la otra, lo que explica por qué estos dos compuestos tienen papeles biológicos diferentes a pesar de ser químicamente muy parecidos.

En el segundo tipo de estereoisomería, los cuatro sustituyentes diferentes unidos a un átomo de carbono tetraédrico pueden ordenarse en el espacio de dos maneras diferentes (es decir, tener dos configuraciones), dando lugar a dos estereoisómeros con propiedades químicas similares o idénticas, pero que difieren en algunas propiedades físicas y biológicas. Se dice que un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes es asimétrico, y los carbonos asimétricos se denominan **centros quirales** (del griego *chiros*, "mano"; algunos estereoisómeros se relacionan estructuralmente entre sí como la mano izquierda con la derecha). Una molécula con un solo carbono quiral puede tener dos estereoisómeros; si los carbonos quirales son dos o más (n), puede haber 2^n estereoisómeros. Los estereoisómeros que son imágenes especula-



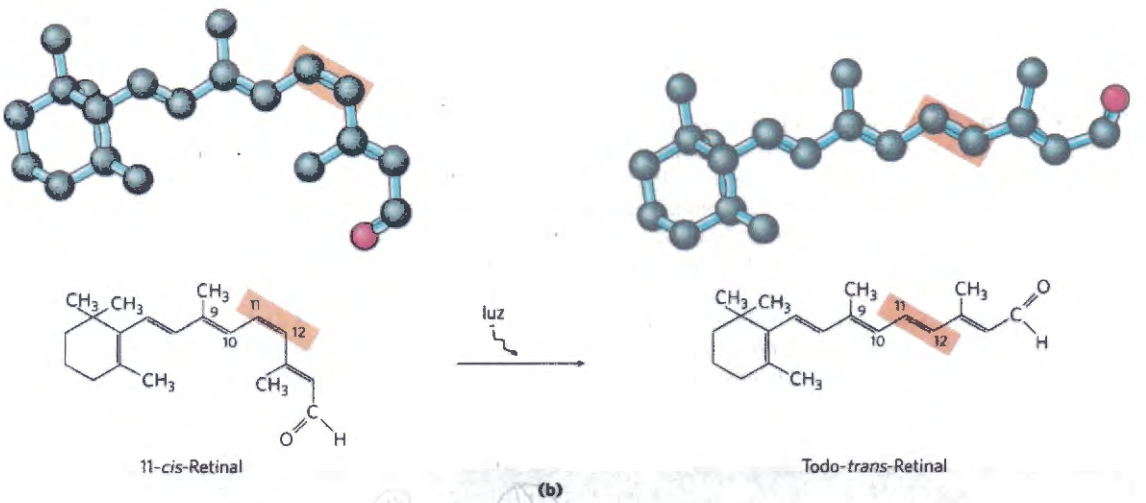


FIGURA 1-20 Configuraciones de isómeros geométricos. **(a)** Los isómeros como el ácido maleico (maleato a pH 7) y el ácido fumárico (fumarato) no pueden interconvertirse sin la rotura de enlaces covalentes, proceso que consume mucha más energía que la energía cinética media de moléculas a temperatura fisiológica. **(b)** En la retina de los vertebrados, el paso inicial del proceso de detección de la luz es la absorción de la luz visible por parte del 11-*cis*-retinal. La energía de la luz absorbida (aproximadamente 250 kJ/mol) convierte el 11-*cis*-retinal en todo-*trans*-retinal, lo que produce variaciones eléctricas en las células de la retina que dan lugar al impulso nervioso. (Obsérvese que en los modelos de bolas y varillas de los retinales se omiten los átomos de hidrógeno).

res entre ellos se denominan **enantiómeros (Fig. 1-21)**. Las parejas de estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan **diastereómeros (Fig. 1-22)**.

Tal como observó Louis Pasteur en 1848 (Recuadro 1-2), los enantiómeros tiene reactividades químicas casi idénticas pero se diferencian en una propiedad física característica: su interacción con la luz polarizada en el plano. En disoluciones separadas, los dos enantiómeros rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, pero una disolución equimolar de los dos enantiómeros (una **mezcla racémica**) no provoca rotación óptica. Los compuestos sin centros quirales no rotan el plano de la luz polarizada.

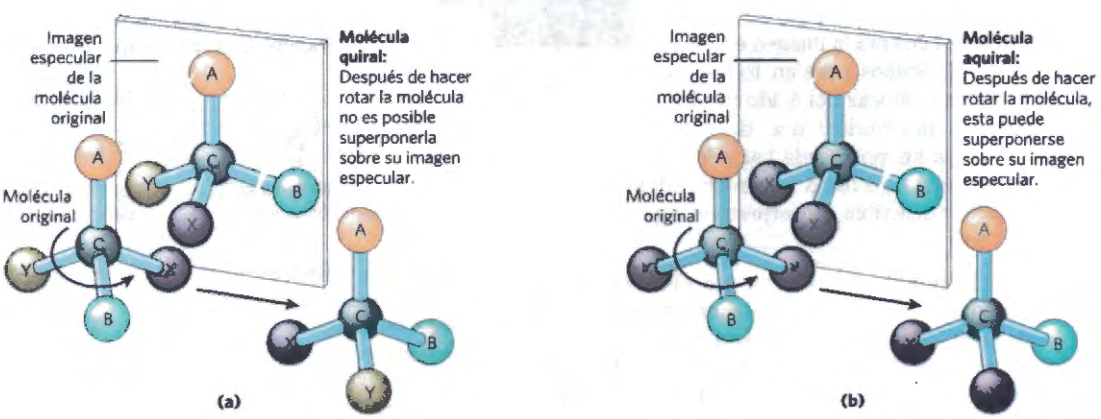


FIGURA 1-21 Asimetría molecular: moléculas quirales y aquirales. **(a)** Cuando un átomo de carbono tiene cuatro grupos sustituyentes diferentes (A, B, X, Y), éstos pueden disponerse de dos maneras diferentes que dan lugar a dos moléculas no superponibles, en las que cada una de ellas es la imagen especular de la otra (enantiómeros). Este átomo de carbono asimétrico se denomina átomo quiral o centro quiral. **(b)** Cuando alrededor del átomo de carbono se disponen únicamente tres sustituyentes diferentes (es decir, uno de los grupos aparece dos veces), solamente es posible una configuración espacial y la molécula es simétrica o aquiral. En este caso la molécula puede superponerse a su imagen especular: la molécula de la izquierda, puede rotar en sentido contrario a las agujas del reloj (cuando se mira hacia abajo por el eje vertical que une A y C) y dar lugar a la molécula del espejo.

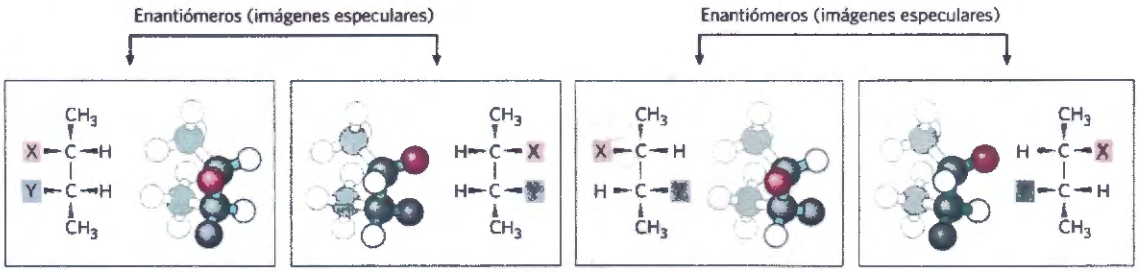


FIGURA 1-22 Enantiómeros y diastereómeros. Hay cuatro estereoisómeros diferentes del butanos 2,3-bisustituido (n = 2 carbonos asimétricos, por lo tanto 2^n = 4 estereoisómeros). Cada uno de ellos se muestra en un recuadro como fórmula en perspectiva y como modelo de bolas y varillas, el cual se ha rotado para permitir que el lector vea todos los grupos. Dos pares de estereoisómeros son imágenes especulares uno del otro, siendo por tanto enantiómeros. Los otros pares no son imágenes especulares y reciben el nombre de diastereómeros. [Fuente: Información de F. Carroll, *Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Co., 1998, p. 63.]

» **Convención Clave:** Dada la importancia de la estereoquímica en las reacciones entre biomoléculas (como se verá más adelante), el bioquímico debe poder denominar y representar la estructura de las biomoléculas de modo que su estereoquímica quede definida sin ambigüedad. El sistema de nomenclatura RS es el más útil para compuestos con más de un centro quiral. En este sistema se asigna una *prioridad* a cada uno de los grupos unidos a un carbono quiral. La prioridad para algunos sustituyentes comunes es la siguiente.

$$-OCH_3 > -OH > -NH_2 > -COOH > -CHO > CH_2OH > -CH_3 > -H$$

Para otorgar un nombre según el sistema RS, el átomo quiral ha de mirarse de modo que el grupo de prioridad más baja (4 en el diagrama siguiente) quede situado en dirección opuesta al observador. Si la prioridad de los otros tres grupos (1 a 3) disminuye según el sentido de las agujas del reloj, la configuración será (*R*) (del latín *rectus*, "derecha") y si va en contra del sentido de las agujas del reloj, la configuración será (*S*) (del latín

RECUADRO 1-2 Louis Pasteur y la actividad óptica: *In vino, veritas*

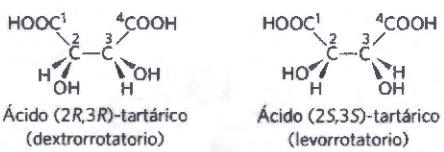
Louis Pasteur se encontró con el fenómeno de la **actividad óptica** en 1843, durante sus investigaciones sobre el material cristalino que se acumulaba en los barriles de vino (una forma del ácido tartárico denominada ácido paratartárico, también conocido como ácido racémico, del latín racemus "racimo de uva"). Pasteur utilizó unas pinzas muy finas para separar dos tipos de cristales cuya forma era idéntica pero de los que cada uno de ellos era la imagen especular del otro. Ambos poseían todas las propiedades químicas del ácido tartárico pero, al disolverlos, uno de ellos hacía rotar la luz polarizada hacia la izquierda (levorrotatorio) y el otro hacia la derecha (dextrorrotatorio). Pasteur describió e interpretó el experimento de este modo:



Louis Pasteur 1822-1895 [Fuente: The Granger Collection.]

> En los cuerpos isoméricos, los elementos y las proporciones en las que se encuentran combinados son los mismos, tan sólo la disposición de los átomos es diferente... Sabemos, por un lado, que las disposiciones moleculares de los dos ácidos tartáricos son asimétricas y, por el otro, que estas disposiciones son absolutamente idénticas, a excepción de que exhiben asimetría en direcciones opuestas. ¿Se encuentran los átomos del ácido dextro agrupados en forma de una espiral dextrógira, situados en el ápice de un tetraedro irregular, o bien ordenados según esta o aquella disposición asimétrica? No lo sabemos.*

Ahora sí lo sabemos. Los estudios cristalográficos con rayos X confirmaron en 1951 que las formas levógira y dextrógira del ácido tartárico son imágenes especulares entre ellas a nivel molecular y permitieron establecer la configuración absoluta de cada una de ellas (Fig. 1). Se ha utilizado la misma metodología para demostrar que, aunque el aminoácido alanina existe en dos formas estereoisoméricas (denominadas D y L), en las proteínas la alanina se presenta sólo en una de las formas (el isómero L; véase el capítulo 3).



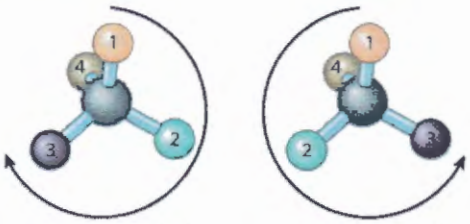
Ácido (2*R*,3*R*)-tartárico (dextrorrotatorio)

Ácido (2*S*,3*S*)-tartárico (levorrotatorio)

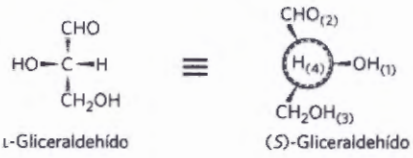
FIGURA 1 Pasteur separó cristales de dos estereoisómeros del ácido tartárico y demostró que las disoluciones de los dos compuestos por separado daban lugar al mismo grado de rotación de luz polarizada pero en direcciones opuestas. Más tarde se demostró que las formas dextrógira y levógira correspondían a las formas isoméricas (*R*,*R*) y (*S*,*S*) aquí mostradas. En el texto se describe el sistema de nomenclatura RS.

*Extraído de la conferencia de Pasteur en la Société Chimique de París en 1883, citada en DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science*, p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

sinister, "izquierda"). De esta manera cada carbono quiral se designa como (*R*) o (*S*), y la inclusión de esas designaciones en el nombre del compuesto proporciona una descripción inequívoca de la estereoquímica de cada centro quiral.



En el Capítulo 3 se describe otro sistema de nomenclatura, el sistema D y L. Una molécula con un solo centro quiral (los dos isómeros del gliceraldehído, por ejemplo) puede nombrarse sin ambigüedad con cualquiera de los dos sistemas.



El concepto de **conformación** molecular, distinto del de configuración, describe la disposición espacial de los grupos sustituyentes que, gracias a la libertad de rotación alrededor de enlaces simples, tienen libertad para adoptar posiciones diferentes en el espacio sin necesidad de romper enlaces. Por ejemplo, en el etano, un hidrocarburo sencillo, existe libertad casi total de rotación alrededor del enlace simple C—C. Según el grado de rotación del enlace son posibles muchas conformaciones diferentes e interconvertibles de la molécula de etano, **(Fig. 1-23)**. Dos de las conformaciones son de especial interés: la conformación alternada, que es más estable que las demás y es por tanto la conformación predominante, y la forma eclipsada, que es menos estable. No es posible aislar ninguna de estas dos formas conformacionales puesto que se hallan en equilibrio y son interconvertibles. Sin embargo, cuando se reemplazan uno o más átomos de hidrógeno de cada uno de los carbonos con grupos funcionales voluminosos o cargados eléctricamente, la libertad de rotación alrededor del enlace C—C queda restringida, lo que limita el número de conformaciones estables de los derivados del etano.

Las interacciones entre las biomoléculas son estereoespecíficas

En las interacciones entre biomoléculas, su "encaje" debe ser estereoquímicamente correcto. La estructura tridimensional de las biomoléculas grandes y pequeñas (la combinación de su configuración y su conformación) es de primordial importancia en sus interacciones biológicas: un reactivo con su enzima, una hormona con su receptor en una superficie celular, un antígeno con su

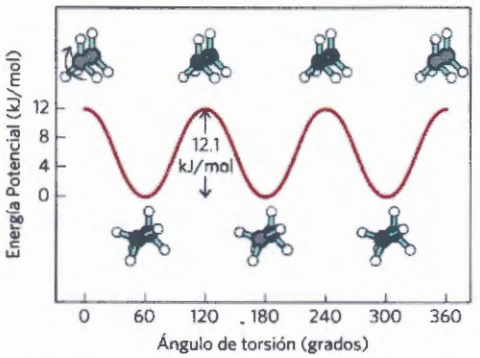


FIGURA 1-23 Conformaciones. El etano tiene muchas conformaciones posibles al existir libertad de rotación alrededor del enlace simple C—C. En el modelo de bolas y varillas, cuando el átomo de carbono anterior (desde el punto de vista del lector) y sus tres átomos de hidrógeno rotan con relación al átomo de carbono posterior, la energía potencial de la molécula aumenta hasta un máximo en la conformación completamente eclipsada (con ángulos de torsión de 0°, 120°, etc.), y disminuye hasta el mínimo en la conformación completamente alternada (ángulo de torsión de 60°, 180°, etc.). Las diferencias de energía son lo suficientemente pequeñas como para permitir la rápida interconversión de las dos formas (millones de veces por segundo), por lo que resulta imposible aislar separadamente las formas eclipsada y alternada.

anticuerpo específico son ejemplos de ello **(Fig. 1-24)**. El estudio de la estereoquímica biomolecular mediante métodos físicos precisos constituye una parte importante de la moderna investigación sobre estructura celular y función bioquímica.

Las moléculas quirales de los organismos vivos se encuentran generalmente presentes en sólo una de sus formas quirales. Por ejemplo, los aminoácidos están presentes en las proteínas sólo como isómeros L; la glucosa se encuentra presente tan sólo en forma de su isómero D. (En el Capítulo 3 se describen las convenciones para denominar los estereoisómeros de los aminoácidos; las

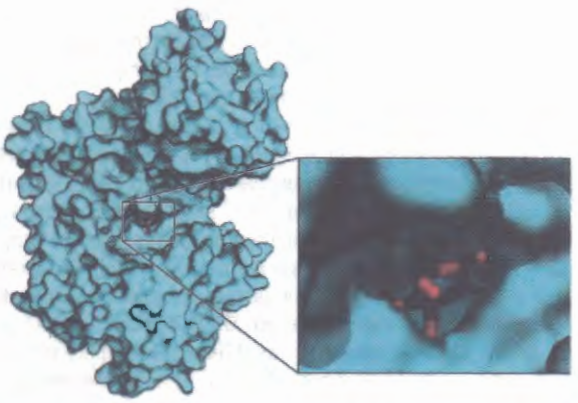


FIGURA 1-24 Encaje complementario de una macromolécula y una molécula pequeña. Una molécula de glucosa encaja en un bolsillo de la superficie del enzima hexoquinasa (PDB ID 3B8A), y se mantiene en esta orientación gracias a diversas interacciones no covalentes entre la proteína y el azúcar. Esta representación de la molécula de hexoquinasa se ha generado con un programa que calcula la forma de la superficie externa de la macromolécula, definida ya sea a partir del radio de van der Waals de todos los átomos de la molécula o mediante el "volumen de exclusión del disolvente", el volumen impenetrable para una molécula de agua. [Fuente: PDB ID 3B8A, P. Kuser et al., *Proteins* 72:731, 2008.]

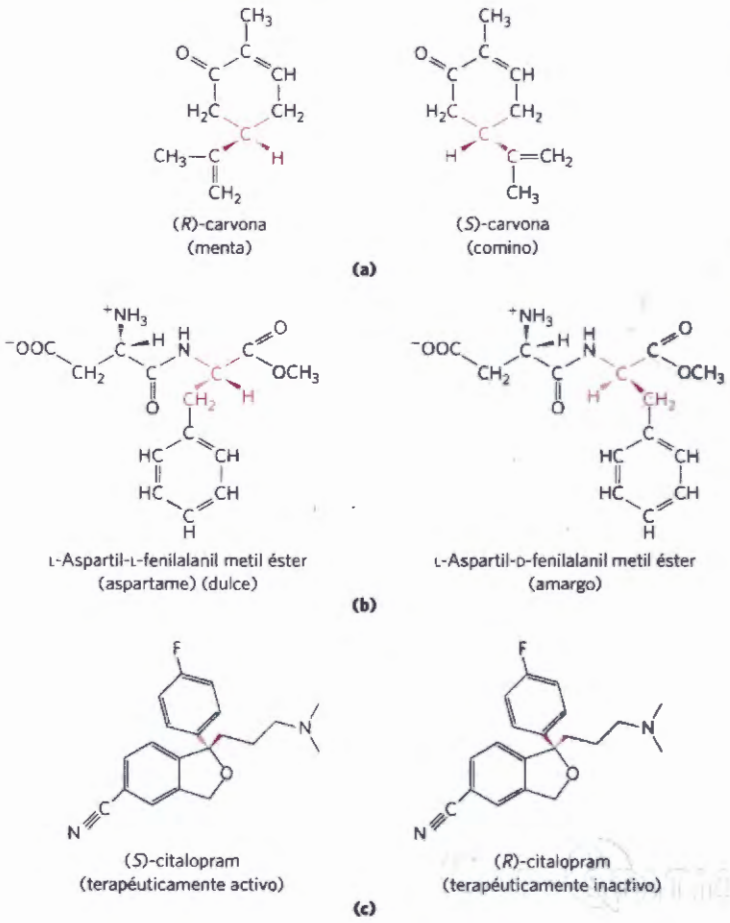


FIGURA 1-25 Los estereoisómeros tienen efectos diferentes sobre el ser humano. (a) Dos estereoisómeros de la carvona: la (*R*)-carvona (aislada del aceite de menta) posee la fragancia característica de la menta; la (*S*)-carvona (de aceite de semillas de comino) huele a comino **(b)** Aspartame, el edulcorante comercializado con el nombre de NutraSweet, se distingue fácilmente de su estereoisómero amargo, a pesar de que ambos difieren tan sólo en la configuración de uno de los dos átomos de carbono quirales. **(c)** El medicamento antidepresivo citalopram (comercializado como Celexa), un inhibidor selectivo de la reabsorción de serotonina, es una mezcla racémica de los dos estereoisómeros pero tan sólo el (*S*)-citalopram tiene efecto terapéutico. El preparado esteroquímicamente puro de (*S*)-citalopram (oxalato de escitalopram) se comercializa bajo el nombre de Lexapro. Como es predecible, la dosis efectiva de Lexapro es la mitad de la dosis efectiva de Celexa.

correspondientes a los glúcidos se describen en el Capítulo 7; el sistema RS, descrito anteriormente, es el más útil para algunas biomoléculas). En cambio, cuando un compuesto que posee un átomo de carbono asimétrico se sintetiza químicamente en el laboratorio, la reacción suele producir todas las formas quirales posibles, formando, por ejemplo, una mezcla de formas D y L. En las células vivas se produce una sola forma quiral gracias a que los enzimas que sintetizan los compuestos quirales son también, a su vez, moléculas quirales.

La estereoespecificidad, o capacidad de distinguir entre estereoisómeros, es una propiedad de los enzimas y otras proteínas y un rasgo característico de la lógica molecular de las células vivas. Si el sitio de unión en una proteína es complementario para un isómero de un compuesto quiral, no será complementario para el otro isómero, por la misma razón por la que un guante izquierdo no sirve para la mano derecha. En la **Figura 1-25** se muestran algunos ejemplos notables de la capacidad de los sistemas biológicos para distinguir entre estereoisómeros.

En el Capítulo 13 se describen las clases comunes de reacciones químicas que se encuentran en la bioquímica, como una introducción a las reacciones del metabolismo.

RESUMEN 1.2 Fundamentos químicos

- Gracias a su versatilidad de enlace, el átomo de carbono puede producir una amplia variedad de esqueletos carbono-carbono con diversidad de grupos funcionales; estos grupos son los que les confieren su personalidad biológica y química a las biomoléculas.
- Las células vivas contienen un conjunto casi universal compuesto por aproximadamente unas mil moléculas de bajo peso molecular; las interconversiones de estas moléculas en las rutas metabólicas centrales se han conservado a lo largo de la evolución.
- Las proteínas y los ácidos nucleicos son polímeros lineales de subunidades monoméricas simples; sus secuencias contienen la información necesaria para definir su estructura tridimensional y sus funciones biológicas.
- La única manera de cambiar la configuración molecular es mediante la rotura de enlaces covalentes. Si un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes (un carbono quiral), éstos pueden ordenarse de dos modos diferentes, generando estereoisómeros con propiedades diferentes. Sólo uno de los estereoisómeros es biológicamente activo. La conformación molecular es la posición de los átomos en el espacio resultante de la rotación alrededor de enlaces sencillos, sin que haya rotura de enlaces covalentes.
- De modo prácticamente invariable, las interacciones entre moléculas biológicas son estereoespecíficas: requieren el encaje de estructuras complementarias de las moléculas que interactúan.

1.3 Fundamentos físicos

Las células y organismos vivos deben producir trabajo para mantenerse vivas y reproducirse. Las reacciones

sintéticas celulares requieren aporte de energía del mismo modo que los procesos sintéticos industriales. También se necesita un aporte de energía en el movimiento de una bacteria o en el de un esprínter olímpico, en el destello de una luciérnaga o en la descarga eléctrica de una anguila. Además, el almacenaje y la expresión de la información tienen un coste energético, sin el cual las estructuras ricas en información perderían inevitablemente su orden y, por ende, su significado.

Las células han desarrollado, a lo largo de la evolución, mecanismos muy eficientes para el acoplamiento de la energía obtenida de la luz solar o de los combustibles con muchos procesos celulares que consumen energía. Uno de los objetivos de la bioquímica es comprender, en términos químicos y cuantitativos, los mecanismos de extracción, almacenamiento y canalización de la energía para obtener trabajo útil en las células vivas. Al igual que con otras conversiones energéticas, podemos considerar las conversiones de la energía celular en el contexto de las leyes de la termodinámica.

Los organismos vivos existen en un estado estacionario dinámico y no se encuentran nunca en equilibrio con su entorno

Las moléculas e iones de un organismo vivo difieren en cuanto a tipo y concentración de las que se encuentran en su entorno. Un paramecio en una charca, un tiburón en el océano, una bacteria del suelo, o un manzano en un jardín, todos ellos tienen una composición diferente a la de su entorno y, una vez han llegado a su madurez, mantienen una composición más o menos constante aun cuando su entorno cambie constantemente

A pesar de que la composición característica de un organismo varía poco a lo largo del tiempo, la población de moléculas dentro del organismo se encuentra lejos de ser estática. Continuamente se sintetizan y se degradan pequeñas moléculas, macromoléculas y complejos supramoleculares mediante reacciones químicas que necesitan del constante flujo de masa y energía a través del sistema. Las moléculas de hemoglobina que están transportando en este momento oxígeno desde sus pulmones a su cerebro se sintetizaron durante el pasado mes; dentro del próximo mes se habrán degradado y habrán sido reemplazadas completamente por nuevas moléculas de hemoglobina. La glucosa que ingirió en la última comida se encuentra ahora circulando por su torrente circulatorio; antes de que termine el día estas mismas moléculas de glucosa se habrán convertido en otra cosa -dióxido de carbono o grasa, tal vez- y habrán sido reemplazadas por un aporte fresco de glucosa, de modo que su concentración de glucosa en sangre se mantenga más o menos constante a lo largo del día. La cantidad de hemoglobina y glucosa en sangre permanece prácticamente constante porque la velocidad de síntesis o ingestión de cada una de ellas compensa con exactitud la velocidad de su degradación, consumo o conversión en algún otro producto. La constancia en la concentración es el resultado de un *estado estacionario dinámico*, un estado estacionario que se encuentra lejos del equilibrio. El mantenimiento de este estado estacionario requiere del aporte constante de energía; cuando la célula ya no es capaz de obtener energía, muere e inicia su degradación hacia el equilibrio con su entorno. A continuación veremos qué es lo que se conoce exactamente como "estado estacionario" y "equilibrio".

Los organismos transforman energía y materia de su entorno

Para las reacciones químicas que tienen lugar en solución, podemos definir un **sistema** como el conjunto de los reactivos y productos presentes, el disolvente que los contiene y la atmósfera circundante o, dicho de otro modo, todo aquello que está incluido en una región definida del espacio. El conjunto del sistema y su entorno configuran el **universo.** Si el sistema no intercambia materia ni energía con su entorno, se denomina **aislado**. Si el sistema intercambia energía pero no materia con su entorno es un sistema **cerrado**; si intercambia materia y energía, es un sistema **abierto**.

Un organismo vivo es un sistema abierto que intercambia materia y energía con su entorno. Los organismos extraen energía de su entorno de dos maneras: (1) captan combustibles químicos (como por ejemplo glucosa) del entorno y extraen energía de su oxidación (véase el Recuadro 1-3, Caso 2); o (2) absorben energía de la luz solar.

La primera ley de la termodinámica describe el principio de conservación de la energía: en cualquier proceso físico o químico la cantidad de energía total del universo permanece constante, aunque su forma puede variar. Esto significa que, si bien el sistema "usa" energía, ésta no se "agota"; en lugar de eso, es convertida de una forma a otra – desde la energía potencial de los enlaces químicos a, por ejemplo, la energía cinética del calor y el movimiento. Las células son transductores de energía consumados, capaces de interconvertir energía química, electromagnética, mecánica y osmótica con gran eficiencia **(Fig. 1-26)**.

El flujo de electrones proporciona energía para los organismos

Prácticamente todos los organismos vivos derivan su energía, directa o indirectamente, de la energía radiante de la luz solar. En los fotoautótrofos, la descomposición del agua a cargo de la energía de la luz que se produce durante la fotosíntesis cede electrones para la reducción del CO_2 y libera O_2 a la atmósfera:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

(reducción del CO_2 impulsada por la luz)

Las células y los organismos no fotosintéticos (quimiótrofos) obtienen energía para sus necesidades mediante la oxidación de los productos ricos en energía producidos en la fotosíntesis y almacenados en las plantas, y transportando los electrones así adquiridos hacia el O_2 atmosférico para formar agua, CO_2 y otros productos finales, que son reciclados en el medio ambiente:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía}$$

(reacción de oxidación de la glucosa que produce energía)

RECUADRO 1-3 Entropía: las cosas se desmoronan

El término "entropía", que literalmente significa "cambio en el interior", fue utilizado por primera vez en 1851 por Rudolf Clausius, uno de los autores que formularon la segunda ley de la termodinámica. Se refiere a la aleatoriedad o desorden de los componentes de un sistema químico. La entropía es un concepto central en bioquímica; la vida requiere un mantenimiento continuo del orden para contrarrestar la tendencia de la naturaleza a incrementar el desorden. La definición cuantitativa rigurosa de la entropía implica consideraciones estadísticas y probabilísticas. No obstante, se puede ilustrar su naturaleza de forma cualitativa con tres ejemplos sencillos, cada uno de los cuales muestra un aspecto de la entropía. Los rasgos clave que describen la entropía son *azar* o *aleatoriedad* y *desorden*, que se manifiestan en formas diversas.

Caso 1: La tetera y la distribución aleatoria del calor

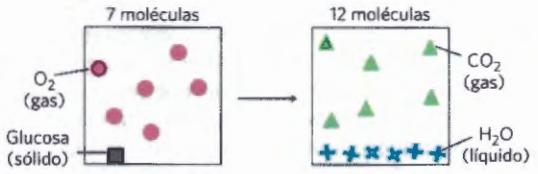
Sabemos que el vapor que se genera a partir del agua hirviente puede realizar trabajo útil. Pero supongamos que apagamos el fogón debajo de una tetera llena de agua a 100 °C (el "sistema") en la cocina (el "entorno") y la dejamos enfriar. A medida que se enfría, no se produce trabajo, pero el calor pasará de la tetera al entorno, elevando la temperatura del entorno (la cocina) en una cantidad infinitesimalmente pequeña hasta alcanzar el equilibrio completo. En este momento todas las partes de la tetera y de la cocina estarán exactamente a la misma temperatura. La energía libre que en un momento estaba concentrada en la tetera de agua caliente a 100 °C, *potencialmente* capaz de realizar trabajo, ha desaparecido. Su equivalente en energía calórica está aún presente en la tetera + cocina (es decir, el "universo"), pero se ha distribuido aleatoriamente entre todo el conjunto. Esta energía ya no sirve para realizar trabajo porque no hay diferencial de temperatura dentro de la cocina. Además, el aumento de entropía de la cocina (el entorno) es irreversible. Sabemos de la experiencia diaria que el calor nunca vuelve atrás espontáneamente desde la cocina a la tetera para volver a elevar la temperatura del agua a 100 °C.

Caso 2: Oxidación de la glucosa

La entropía es un estado no sólo de la energía sino también de la materia. Los organismos aeróbicos (heterótrofos) extraen energía libre de la glucosa obtenida de su entorno a través de la oxidación de la glucosa con O_2, también obtenido del entorno. Los productos finales de este metabolismo oxidativo, CO_2 y H_2O, se devuelven al entorno. En este proceso el entorno experimenta un incremento de entropía, mientras que el propio organismo permanece en estado estacionario y no experimenta ningún cambio en su orden interno. Aunque parte de la entropía surge de la disipación de calor, la entropía también proviene de otro tipo de desorden, ilustrado por la ecuación de la oxidación de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

que podemos representar de manera esquemática como



De este modo, los autótrofos y los heterótrofos participan en los ciclos globales del O_2 y del CO_2 impulsados en última instancia por la luz solar, lo que convierte a estos dos grandes grupos de organismos en interdependientes. Prácticamente todas las transducciones energéticas de las células pueden entenderse como un flujo de electrones desde una molécula a otra, en un proceso "cuesta abajo" desde potenciales electroquímicos superiores a inferiores; de este modo, el proceso es formalmente análogo al flujo de electrones en un circuito eléctrico alimentado por una batería eléctrica. Todas las reacciones que implican un flujo de electrones son **reacciones de oxidación-reducción:** un reactivo se oxida (pierde electrones) y otro se reduce (gana electrones).

Crear y mantener el orden requiere trabajo y energía

Como ya hemos visto, el DNA, el RNA y las proteínas son macromoléculas informativas; la secuencia exacta de sus subunidades monoméricas contiene información, igual que las letras de esta frase. Además de usar energía química para formar los enlaces covalentes entre las subunidades de estos polímeros, las células deben invertir energía para ordenar las subunidades en su secuencia correcta. Es extremadamente improbable que los aminoácidos de una mezcla se condensen espontáneamente para formar una proteína de secuencia única. Ello implicaría un aumento del orden en una población de moléculas; pero, según la segunda ley de la termodinámica, la tendencia de cualquier proceso natural es hacia el incremento del desorden del universo: *la entropía total del universo está en constante crecimiento.* Para dar lugar a la síntesis de macromoléculas a partir de sus subunidades monoméricas debe suministrarse energía libre al sistema (la célula en este caso). Discutiremos cuantitativamente la energética de las reacciones de oxidación-reducción en el Capítulo 13.

›› Convención Clave: El desorden de los componentes de un sistema químico se expresa como **entropía, *S*** (Recuadro 1-3). Cualquier variación en el grado de desorden de un sistema se expresa como variación de entropía, ΔS, que, por convención, adopta valores positivos cuando aumenta el desorden. J. Willard Gibbs, que desarrolló la teoría de las variaciones energéticas durante las

RECUADRO 1–3 Entropía: las cosas se desmoronan

Los átomos contenidos en una molécula de glucosa más 6 moléculas de oxígeno, un total de 7 moléculas, se dispersan más a causa de la reacción de oxidación y están ahora presentes en un total de 12 moléculas ($6CO_2 + 6H_2O$).

Siempre que una reacción química transcurre de modo que hay un aumento en el número de moléculas, o cuando una sustancia sólida se convierte en productos gaseosos o líquidos, que permiten más libertad para el movimiento molecular que un sólido, hay un incremento en el desorden molecular y, por tanto, de la entropía.

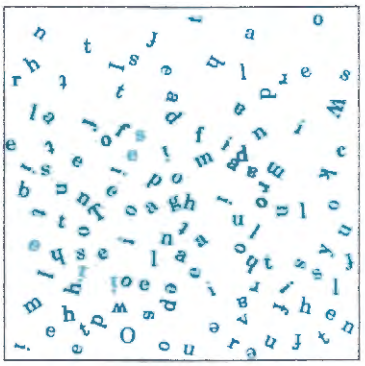
Caso 3: Información y entropía

El siguiente fragmento de *Julio César*, Acto IV, Escena 3, es declamado por Bruto cuando se da cuenta de que se ha de enfrentar al ejército de Marco Antonio. Es un ordenamiento no al azar y rico en información de 125 letras del alfabeto inglés:

> There is a tide in the affairs of men,
> Which, taken at the flood, leads on to fortune;
> Omitted, all the voyage of their life
> Is bound in shallows and in miseries*.

Esta cita tiene muchos significados escondidos además de lo que expresa abiertamente. Además de reflejar una compleja serie de hechos, también se hace eco de las ideas desarrolladas en el drama sobre el conflicto, la ambición y las exigencias del liderazgo. Asentada en los conocimientos de Shakespeare sobre la naturaleza humana, es muy rica en información.

No obstante, si se dejara que las 125 letras que forman esta cita se distribuyeran totalmente al azar, de modo caótico, tal como se muestra en el cuadro siguiente, no tendrían ningún significado en absoluto.



Puestas de esta forma, las 125 letras no contendrían ninguna información, o muy poca, pero serían muy ricas en entropía. Tales consideraciones han llevado a la conclusión de que la información es una forma de energía y se la ha denominado "entropía negativa". De hecho, la rama de las matemáticas denominada teoría de la información, que es básica para la lógica de programación de los ordenadores, está relacionada muy estrechamente con la teoría termodinámica. Los organismos vivos son estructuras muy ordenadas, no al azar, que son inmensamente ricos en información y, por consiguiente, pobres en entropía.

*En los negocios humanos hay una manera que, aprovechada en la pleamar, conduce a la fortuna; pero si no se aprovecha, todo el viaje de la vida va en medio de bajíos y naufragios. SHAKESPEARE, *Dramas*, Editorial Iberia, S.A., Barcelona.



J. Willard Gibbs,1839–1903 [Fuente: Science Source.]

reacciones químicas, demostró que el **contenido en energía libre, *G***, de cualquier sistema cerrado puede definirse en base a tres magnitudes: **entalpía, *H***, que refleja el número y el tipo de enlaces; entropía, S; y la temperatura absoluta, T (en grados Kelvin). La definición de energía libre es: $G = H - TS$. Si una reacción química tiene lugar a temperatura constante, **la variación de energía libre, ΔG**, viene determinada por la variación de entalpía ΔH, que refleja el tipo y la cantidad de enlaces químicos e interacciones no covalentes que se rompen y forman, y la variación de entropía, ΔS, que describe el cambio en el grado de desorden del sistema:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

donde, por definición, ΔH es negativa para una reacción que libera calor y ΔS es positiva para una reacción que incrementa el desorden del sistema. ‹‹

Un proceso tiende a ocurrir espontáneamente sólo si ΔG es negativa (si se *libera* energía libre durante el proceso). Sin embargo, la función celular depende principalmente de moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos, para las que la energía libre de formación es positiva: son moléculas menos estables y más ordenadas que una mezcla de sus componentes monoméricos. Para llevar a cabo estas reacciones termodinámicamente desfavorables que requieren energía (**endergónicas**), la célula las acopla a otras que desprenden energía libre (reacciones **exergónicas**), de modo que el proceso sea globalmente exergónico: la *suma* de las variaciones de energía libre es negativa.

La fuente habitual de energía libre en las reacciones biológicas acopladas es la energía liberada por la hidrólisis de enlaces fosfoanhídrido como los que se encuentran en la adenosina trifosfato (ATP; **Fig. 1-27**) y la

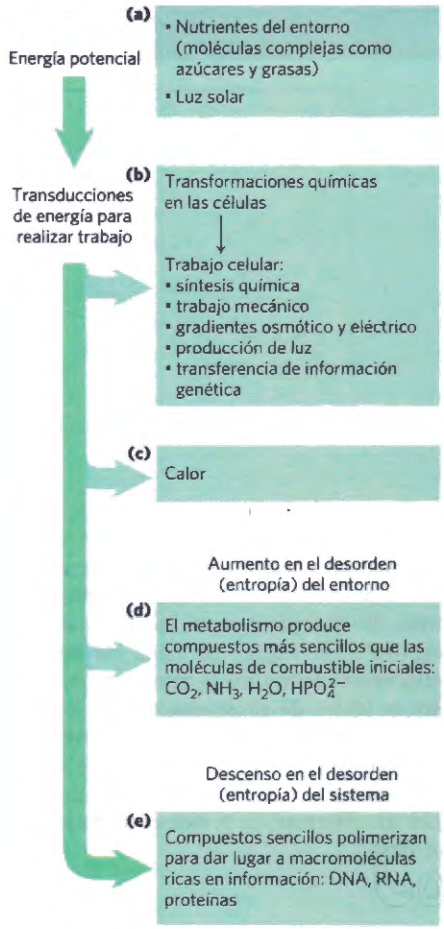


FIGURA 1-26 Algunas transformaciones de energía en los organismos vivos. Al consumir energía metabólica para realizar trabajo celular, el desorden del sistema y de su entorno (expresado cuantitativamente como entropía) aumenta a la vez que la energía potencial de las moléculas nutrientes complejas disminuye. **(a)** Los organismos vivos extraen energía de su entorno, **(b)** convierten parte de ella en formas útiles para producir trabajo; **(c)** devuelven parte de la energía al entorno en forma de calor, y **(d)** liberan moléculas como productos finales menos organizadas que el combustible original, aumentando la entropía del universo. Un efecto de todas estas transformaciones es **(e)** el aumento del orden (disminución el desorden) en el sistema mediante la formación de macromoléculas complejas. En el Capítulo 13 se presenta un tratamiento cuantitativo de la entropía.

guanosina trifosfato (GTP). En la figura siguiente cada Ⓟ representa un grupo fosforilo:

Aminoácidos gproteína $\quad \Delta G_1$ es positiva (endergónica)
ATP g AMP + Ⓟ—Ⓟ $\quad \Delta G_2$ es negativa (exergónica)
[o ATP g ADP + Ⓟ]

Cuando estas reacciones están acopladas, la suma de ΔG_1 y ΔG_2 es negativa (el proceso global es exergónico). Mediante esta estrategia de acoplamiento, la célula puede sintetizar y mantener los polímeros ricos en información esenciales para la vida.

El acoplamiento energético conecta las reacciones biológicas

La cuestión central de la *bioenergética* (el estudio de las transformaciones energéticas en los seres vivos) es el modo por el cual la energía obtenida de la luz o del metabolismo de los combustibles se acopla a las reacciones celulares que requieren energía. Para comprender el acoplamiento de la energía es instructivo considerar un ejemplo mecánico simple como el mostrado en la **Figura 1-28a**. Un objeto situado en la parte superior de un plano inclinado posee una cierta cantidad de energía potencial como resultado de su elevación. Tiende a deslizarse por el plano, perdiendo progresivamente su energía potencial al acercarse al suelo. Si al objeto deslizante se le acopla, mediante un mecanismo de cuerda y polea, un objeto más pequeño, el movimiento espontáneo hacia abajo del más grande puede hacer elevar al más pequeño, realizándose una cierta cantidad de trabajo. La cantidad de energía transformable en trabajo es el **cambio en energía libre,** ΔG; este valor será siempre ligeramente inferior a la cantidad teórica de energía liberada, habida cuenta de que una parte de la energía se disipa en forma de calor de fricción. Cuanto mayor sea la elevación del objeto más grande, mayor será el cambio energético al deslizarse hacia abajo (ΔG) y mayor será la cantidad de trabajo que puede realizar. El objeto más grande puede arrastrar al más pequeño porque, en el inicio, el objeto mayor se hallaba *lejos de su posición de equilibrio*: en algún momento anterior había sido elevado por encima del suelo mediante un proceso que también consumía energía.

¿Cuál es el equivalente de este proceso en reacciones químicas? En sistemas cerrados, las reacciones

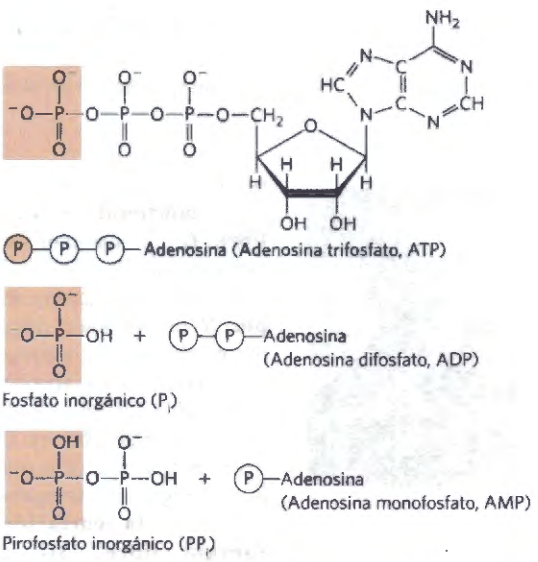


FIGURA 1-27 El adenosina trifosfato (ATP) proporciona energía. Aquí, cada Ⓟ representa un grupo fosforilo. La eliminación del grupo fosforilo terminal del ATP (sombreado en rosa) mediante rotura de un enlace fosfoanhídrido, que genera difosfato de adenosina (ADP) y el ión fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}), es altamente exergónica y se acopla a muchas reacciones endergónicas en la célula (como en el ejemplo de la Figura1-27b). El ATP también proporciona energía para muchos procesos celulares mediante la rotura que libera dos grupos fosfato terminales en forma de pirofosfato inorgánico ($H_2P_2O_7^{2-}$), a menudo abreviado como PP_i.

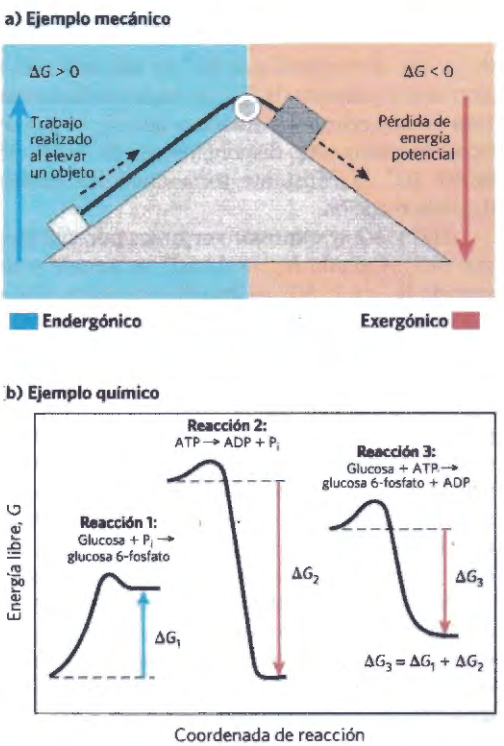


FIGURA 1-28 Acoplamiento energético en procesos químicos y mecánicos. (a) El movimiento descendente de un objeto libera energía potencial capaz de producir trabajo mecánico. La energía potencial liberada por el movimiento descendente espontáneo, un proceso exergónico (rojo), puede acoplarse al movimiento endergónico ascendente de otro objeto (azul). **(b)** En la reacción 1 la formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa y fosfato inorgánico (P_i), da lugar a un producto con una energía superior a la de los reactivos. La ΔG es positiva para esta reacción endergónica. En la reacción 2, la rotura exergónica del adenosina trifosfato (ATP) tiene una variación de energía libre grande y negativa (ΔG_2). La tercera reacción representa la suma de las reacciones 1 y 2, y la variación en su energía libre ΔG_3 es la suma aritmética de ΔG_1 y ΔG_2. Puesto que el valor de ΔG_3 es negativo, la reacción global es exergónica y se da espontáneamente.

químicas se producen espontáneamente hasta que se alcanza el **equilibrio.** Cuando el sistema está en equilibrio, la velocidad de formación de producto es exactamente igual a la velocidad en que el producto se convierte en reactivo. Por lo tanto, no hay cambio neto en la concentración de reactivos y productos. La variación de energía que se produce cuando el sistema evoluciona desde su estado inicial al de equilibrio, sin variaciones en la presión y la temperatura, viene dada por la variación de energía libre, ΔG. La magnitud de ΔG depende de la reacción química concreta y de *lo lejos que el sistema se encuentre inicialmente del equilibrio*. Cada uno de los compuestos implicados en una reacción química contiene una cierta cantidad de energía potencial, que guarda relación con el número y el tipo de enlaces. En las reacciones que ocurren espontáneamente, los productos tienen menos energía libre que los reactivos, de manera que la reacción libera una cantidad de energía libre que está disponible par a realizar trabajo. Estas reacciones son exergónicas y la disminución de energía libre de reactivos a productos se expresa con un valor negativo. Las reacciones endergónicas requieren una aportación de energía, y sus valores de ΔG son positivos. Al igual que en los procesos mecánicos, sólo una parte de la energía liberada en las reacciones bioquímicas exergónicas se puede utilizar para producir trabajo. En los sistemas vivos parte de la energía se disipa en forma de calor o se pierde con el incremento de entropía.

K_{eq} y ΔG° miden la tendencia de una reacción a transcurrir espontáneamente

La tendencia de una reacción química a llegar a su final puede expresarse en forma de una constante de equilibrio. Para la reacción en la que a moles de A reaccionan con b moles de B para dar c moles de C y d moles de D,

$$aA + bB \longrightarrow cC + dD$$

la constante de equilibrio, K_{eq}, viene dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^{c}[D]_{eq}^{d}}{[A]_{eq}^{a}[B]_{eq}^{b}}$$

donde $[A]_{eq}$ es la concentración de A, $[B]_{eq}$ es la concentración de B y así sucesivamente, *cuando el sistema ha llegado al equilibrio*. La K_{eq} no tiene dimensiones (es decir, no se expresa en unidades de medida), pero, como explicamos en la página 50, incluiremos unidades molares en nuestros cálculos para reforzar la idea de que se deben usar concentraciones molares (representadas entre corchetes) en el cálculo de las constantes de equilibrio. Un valor elevado de K_{eq} indica que la reacción tiene lugar hasta que los reactivos se han convertido casi completamente en productos.

EJEMPLO PRÁCTICO 1-1 ¿Están ATP y ADP en equilibrio en la célula?

La constante de equilibrio, K_{eq}, de la reacción siguiente es 2×10^5 M:

$$ATP \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

Si las concentraciones celulares son [ATP] = 5 mM, [ADP] = 0,5 mM y $[P_i]$ = 5 mM, ¿se encuentra esta reacción en equilibrio en la célula?

Solución: La definición de la constante de equilibrio para la reacción es:

$$K_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$$

A partir de las concentraciones medidas que se expresan más arriba, podemos calcular la relación de acción de masas, Q:

$$Q = [ADP][P_i]/[ATP] = [0{,}5\ mM][5\ mM]/[5\ mM]$$
$$= 0{,}5\ mM = 5 \times 10^{-4}\ M$$

Este valor se halla *lejos* de la constante de equilibrio (2×10^5 M), por lo que la reacción se encuentra *muy*

lejos del equilibrio en la célula. [ATP] es mucho mayor, y [ADP] mucho menor, que los valores que se esperan en el equilibrio. ¿Cómo puede una célula mantener su relación [ATP]/[ADP] tan lejos del equilibrio? Lo hace mediante la continua extracción de energía (a partir de nutrientes como la glucosa), usándola después para fabricar ATP a partir de ADP y P_i.

EJEMPLO PRÁCTICO 1-2 ¿Se encuentra la reacción de la hexoquinasa en equilibrio en la célula?

En la reacción catalizada por el enzima hexoquinasa:

Glucosa + ATP g Glucosa 6-fosfato + ADP

La constante de equilibrio, K_{eq}, es $7{,}8 \times 10^2$. En las células vivas de *E. coli*, [ATP] = 5 mM; [ADP] = 0,5 mM; [glucosa] = 2 mM; y [glucosa 6-fosfato] = 1 mM. ¿Está la reacción en equilibrio en *E. coli*?

Solución: En el equilibrio,

$$K_{eq} = 7{,}8 \times 10^2 = [\text{ADP}][\text{glucosa 6-fosfato}]/[\text{ATP}][\text{glucosa}]$$

En las células vivas, [ADP][glucosa 6-fosfato]/[ATP][glucosa] = [0,5 mM][1 mM]/[5 mM][2 mM] = 0,05. La reacción de halla por tanto *lejos* del equilibrio: las concentraciones celulares de los productos (glucosa 6-fosfato y ADP) son mucho menores que las esperadas en el equilibrio, mientras que las de los reactivos son mucho mayores. Por lo tanto, la reacción tiene una gran tendencia a avanzar hacia la derecha.

Gibbs demostró que la ΔG (la variación de energía libre real) de una reacción química cualquiera es función de la **variación de energía libre estándar,** $\Delta G°$,una constante característica de cada reacción específica, y de un término que expresa la concentración inicial de reactivos y productos:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[C]_i^c[D]_i^d}{[A]_i^a[B]_i^b} \qquad (1\text{-}1)$$

donde $[A]_i$ es la concentración inicial de A y así sucesivamente, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

ΔG es una medida de la distancia de un sistema a su posición de equilibrio. Cuando una reacción ha alcanzado el equilibrio no queda ninguna fuerza que la induzca a ir en una dirección u otra y no puede realizar trabajo: $\Delta G = 0$. En esta situación concreta, $[A]_i = [A]_{eq}$ y así sucesivamente para todos los reactivos y productos, de modo que:

$$\frac{[C]_i^c[D]_i^d}{[A]_i^a[B]_i^b} = \frac{[C]_{eq}^c[D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a[B]_{eq}^b}$$

Sustituyendo ΔG por 0 y $[C]_i^c[D]_i^d/[A]_i^a[B]_i^b$ por K_{eq} en la Ecuación 1-1, obtenemos la relación

$$\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$$

de la que deducimos que $\Delta G°$ es tan sólo una manera alternativa (además de K_{eq}) de expresar la fuerza impulsora en una reacción. Gracias a que K_{eq} se puede medir experimentalmente, disponemos de un modo de determinar $\Delta G°$, la constante termodinámica característica de cada reacción.

$\Delta G°$ y ΔG se expresan en joules por mol (o calorías por mol). Cuando $K_{eq} >> 1$, $\Delta G°$ es grande y negativa; cuando $K_{eq} << 1$, $\Delta G°$ es grande y positiva. Con un simple vistazo a una tabla de valores de K_{eq} o de $\Delta G°$ es fácil deducir cuáles son las reacciones que tenderán a producirse y cuáles no.

Hay que tomar una precaución en cuanto a la interpretación de $\Delta G°$: las constantes *termodinámicas* como ésta muestran dónde se halla el punto de equilibrio final de la reacción, pero nada nos dicen acerca de la velocidad con que se alcanza. La velocidad de las reacciones viene gobernada por los parámetros *cinéticos*, un tema que consideraremos en el Capítulo 6.

En los organismos biológicos, al igual que ocurre en el ejemplo mecánico de la figura 1-28a, una reacción exergónica se puede acoplar a una reacción endergónica para hacer posibles ciertas reacciones que de otro modo serían desfavorables. La figura 1-28b (una clase de gráfico que se denomina diagrama de coordenada de reacción) ilustra este principio para el caso de la conversión de glucosa en glucosa 6-fosfato, el primer paso de la oxidación de glucosa. El camino más simple para producir glucosa 6-fosfato sería:

Reacción 1: Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato
(endergónica; ΔG_1 es positiva)

(No se preocupe de momento por la estructura de estos compuestos; la describiremos más adelante en este libro). Esta reacción no ocurre espontáneamente porque ΔG_1 es positiva. Una segunda reacción muy exergónica puede tener lugar en todas las células:

Reacción 2: ATP ⟶ ADP + P_i
(exergónica; ΔG_2 es negativa)

Estas dos reacciones comparten un intermediario común, Pi, que se consume en la reacción 1 y se produce en la reacción 2. Las dos reacciones pueden, por tanto, acoplarse en la forma de una tercera reacción que se puede escribir como la suma de las reacciones 1 y 2, omitiendo el intermediario común, P_i, de los dos lados de la ecuación:

Reacción 3: Glucosa + ATP ⟶
glucosa 6-fosfato + ADP

Puesto que se libera más energía en la reacción 2 que la consumida en la reacción 1, la variación de energía libre en la reacción 3, ΔG_3, es negativa, lo que hace posible que la síntesis de glucosa 6-fosfato transcurra a través de la reacción 3.

EJEMPLO PRÁCTICO 1-3 Los cambios de energía libre estándar son aditivos

Dados los valores de variación de energía libre estándar de 13,8 kJ/mol para la reacción glucosa + Pi → glucosa 6-fosfato y de -30,5 kJ/mol para la reacción ATP → ADP + Pi, ¿Cuál es la variación de energía libre estándar para la reacción Glucosa + ATP → Glucosa 6-fosfato + ADP?

Solución: Podemos escribir una ecuación para esta reacción como suma de las otras dos reacciones:

(1) Glucosa + P_i g glucosa 6-fosfato $\quad \Delta G^\circ_1 = 13{,}8$ kJ/mol
(2) ATP g ADP + P_i $\quad \Delta G^\circ_2 = -30{,}5$ kJ/mol

Suma: Glucosa + ATP g glucosa 6-fosfato + ADP
$\Delta G^\circ_{suma} = -16{,}7$ kJ/mol

La variación de energía libre estándar de dos reacciones que sumadas dan una tercera es simplemente la suma de los valores de las dos reacciones individuales. Un valor negativo de ΔG° (-16,7 kJ/mol) indica que la reacción tenderá a proceder espontáneamente

El acoplamiento de reacciones exergónicas y endergónicas a través de un intermediario compartido es absolutamente básico para los intercambios energéticos en los sistemas vivos. Tal como veremos, las reacciones de hidrólisis del ATP (como la reacción 2 en la Fig. 1-28b) liberan energía que hace posible muchos procesos endergónicos en las células. La hidrólisis de ATP en las células es exergónica porque *todas las células vivas mantienen la concentración de ATP muy por encima de su concentración en el equilibrio*. Es este desequilibrio el que permite que el ATP sirva como el principal portador de energía química en todas las células. Tal como veremos en mayor detalle en el Capítulo 13, no es la simple rotura del ATP la que proporciona la energía para impulsar las reacciones endergónicas, sino que es la *transferencia de un grupo fosforilo* desde el ATP a otra molécula pequeña (glucosa en el caso anterior) la que conserva parte del potencial químico presente originalmente en el ATP.

EJEMPLO PRÁCTICO 1-4 Coste energético de la síntesis de ATP

Si la constante de equilibrio, K_{eq}, de la reacción

ATP g ADP + P_i

es igual a 2,22 x 10^5M, calcule la variación de energía libre estándar, ΔG°, para la *síntesis* de ATP a partir de ADP y P_i a 25°C.

Solución: Calculemos en primer lugar la ΔG° para la reacción anterior.

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -RT\ln K_{eq} \\ &= -(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(298\ \text{K})(\ln 2{,}22 \times 10^5) \\ &= -30{,}5\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

Esta es la variación de energía libre estándar para la *hidrólisis* de ATP a ADP y P_i. La variación de energía libre estándar para la reacción *inversa* tiene el mismo valor absoluto pero signo opuesto. La variación de energía libre estándar de la reacción inversa a la anterior es, por tanto, de 30,5 kJ/mol. En consecuencia, para sintetizar 1 mol de ATP en condiciones estándar (25°C, concentraciones 1 M de ATP, ADP y P_i), hace falta suministrar al sistema al menos 30,5 kJ de energía. La variación real de energía libre en la célula, aproximadamente 50 kJ/mol, es superior a este valor porque las concentraciones de ATP, ADP y P_i en la célula no son las estándar de 1M (véase el Ejemplo Práctico 13-2, p. 509).

EJEMPLO PRÁCTICO 1-5 Variación de energía libre estándar de la síntesis de Glucosa 6-fosfato

¿Cuál es, en condiciones fisiológicas (*E. coli* crece en el intestino humano a 37°C), la variación de energía libre estándar, ΔG°, de la siguiente reacción?

Glucosa + ATP g Glucosa 6-fosfato + ADP

Solución: Conocemos la relación $\Delta G^\circ = -RT\ln K_{eq}$ y el valor de la K_{eq} para esta reacción, 7,8 X 10^2. Sustituyendo los valores de R, T, y K_{eq} en la ecuación obtenemos:

$$\Delta G^\circ = -(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})(\ln 7{,}8 \times 10^{*2*}) = -17\ \text{kJ/mol}.$$

Observe que este valor es ligeramente diferente del encontrado en el Ejemplo Práctico 1-3. En aquel cálculo partimos de una temperatura de 25°C (298 K), mientras que en el presente cálculo hemos usado la temperatura fisiológica de 37°C (310 K).

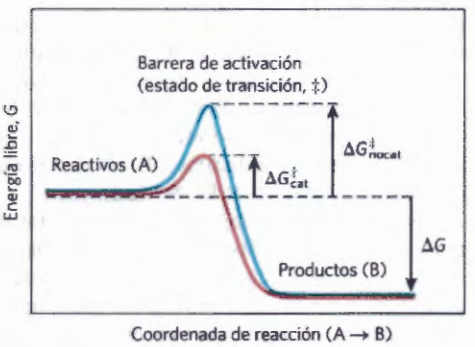


FIGURA 1-29 Cambios energéticos durante una reacción química. En el proceso de conversión de los reactivos (A) en productos (B) debe salvarse una barrera de activación que representa el estado de transición (véase el Capítulo 6), a pesar de que los productos sean más estables que los reactivos, tal como indica la gran variación negativa de energía libre (ΔG). La energía necesaria para superar la barrera de activación es la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$). Los enzimas catalizan las reacciones disminuyendo la barrera de activación. Se unen fuertemente a los intermedios del estado de transición y la energía de enlace de esta interacción reduce la energía de activación de modo efectivo desde $\Delta G^{\ddagger}_{nocat}$ (curva azul) hasta $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ (curva roja). (Observe que la energía de activación *no* está relacionada con la variación de la energía libre de la reacción, ΔG.)

Los enzimas facilitan secuencias de reacciones químicas

Todas las macromoléculas biológicas son mucho menos estables termodinámicamente que sus subunidades monoméricas, aunque sean, no obstante, *estables cinéticamente*: su degradación *no catalizada* ocurre tan lentamente (en un margen de años y no de segundos) que, en la escala de tiempo aplicable a los organismos, estas moléculas son estables. Si prácticamente todas las reacciones químicas celulares tienen lugar a una velocidad significativa es gracias a la presencia de **enzimas,** biocatalizadores que, al igual que el resto de catalizadores, provocan un gran incremento en la velocidad de reacciones químicas específicas sin consumirse en el proceso.

La trayectoria desde reactivo(s) a producto(s) transcurre de manera prácticamente universal a través de una barrera energética, denominada barrera de activación **(Fig. 1-29)**, que debe ser superada para que tenga lugar la reacción. La rotura y formación de enlaces implica generalmente y de manera previa la distorsión de los enlaces existentes, lo que genera un **estado de transición** de mayor energía libre que reactivos o productos. El punto más alto en un diagrama de coordenadas de reacción representa el estado de transición y la diferencia de energía entre un reactivo en su estado fundamental y en su estado de transición se denomina **energía de activación**, $\Delta G^{\ddagger}$. Los enzimas catalizan reacciones al proporcionar un entorno más confortable para el estado de transición: una superficie complementaria a su estereoquímica, polaridad y carga. La unión de un enzima al estado de transición es exergónica, y la energía liberada por esa unión reduce la energía de activación de la reacción e incrementa de modo muy importante su velocidad de reacción.

Una contribución adicional a la catálisis ocurre cuando dos o más reactivos se unen a la superficie del enzima en lugares cercanos y en una orientación estereospecífica que favorece la reacción. Gracias a esta disposición se incrementa en varios órdenes de magnitud la probabilidad de que se produzcan colisiones productivas entre los reactivos. Como resultado de estos y otros factores que se discuten en el Capítulo 6, las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar generalmente a velocidades mayores que 10^{12} veces las de las reacciones no catalizadas. (Equivalente a un *¡millón de millones* de veces más rápidas!)

Salvo algunas excepciones notables, los catalizadores celulares son proteínas. (Como se discutirá en los Capítulos 26 y 27, algunas moléculas de RNA poseen actividad enzimática.) También de modo casi universal, cada enzima cataliza una reacción específica, y cada reacción en la célula esta catalizada por un enzima diferente. Es, por tanto, evidente que en cada célula son necesarios miles de enzimas diferentes. La multiplicidad de los enzimas, su especificidad (la capacidad de discriminar entre diferentes reactivos) y su susceptibilidad a la regulación confieren a las células la capacidad de disminuir selectivamente las barreras de activación. Esta selectividad resulta crucial para la regulación efectiva de los procesos celulares. Haciendo que las reacciones específicas procedan a velocidades significativas, los enzimas determinan de qué modo se canalizan la materia y la energía hacia las actividades celulares.

Los millares de reacciones químicas catalizadas por enzimas en el interior de las células, se encuentran organizadas en muchas secuencias de reacciones consecutivas denominadas **rutas** (o **vías**), en las que el producto de una reacción pasa a ser el reactivo de la siguiente. Algunas de estas rutas degradan nutrientes orgánicos transformándolos en productos finales sencillos, con el fin de extraer de ellos energía química y convertirla en una forma útil para la célula; en conjunto, estas reacciones degradativas productoras de energía libre reciben el nombre de **catabolismo**. La energía liberada por las reacciones catabólicas es usada en la síntesis del ATP. Como resultado de ello, la concentración celular de ATP se halla muy por encima de su concentración en el equilibrio, de modo que la ΔG de la hidrólisis del ATP es grande y negativa. De modo similar, el catabolismo tiene como resultado la producción de los transportadores de electrones reducidos NADH y

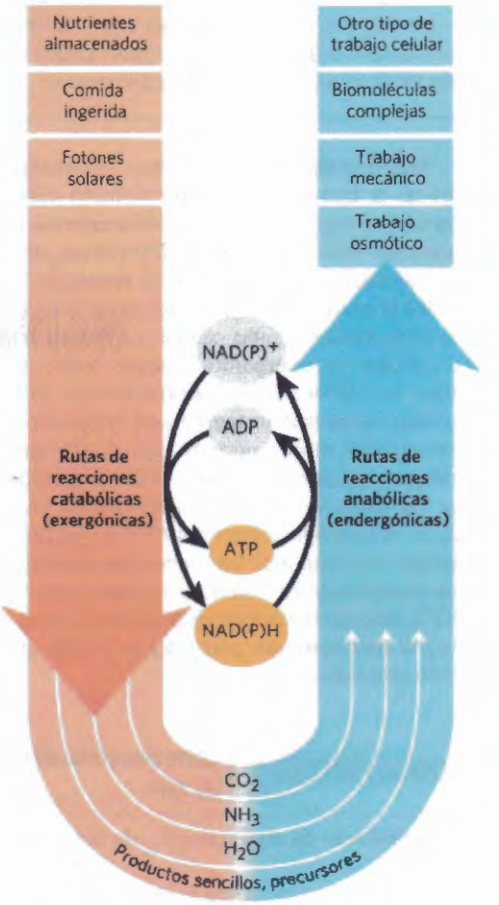


FIGURA 1-30 Papel central del ATP y el NAD(P)H en el metabolismo. El ATP es el intermediario químico que conecta los procesos que liberan energía con aquellos que requieren aporte de energía. Su papel en la célula es análogo al del dinero en las relaciones comerciales: se "gana/produce" en reacciones exergónicas y se "gasta/consume" en las endergónicas. El NAD(P)H (dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato)) es un cofactor transportador de electrones que capta electrones en reacciones oxidativas para donarlos a continuación en una gran variedad de reacciones biosintéticas reductoras. Presentes en concentraciones relativamente pequeñas, estos cofactores esenciales para las reacciones anabólicas deben ser constantemente regenerados por reacciones catabólicas.

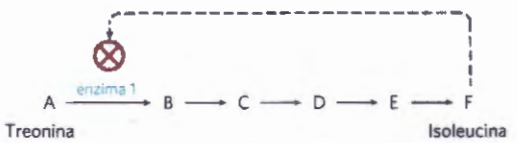
NADPH, que pueden donar electrones en procesos que generan ATP o impulsar pasos reductores en vías biosintéticas.

Otras rutas parten de pequeñas moléculas precursoras y las convierten en moléculas progresivamente mayores y más complejas, entre las que se incluyen las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas rutas sintéticas que requieren, invariablemente, un aporte de energía reciben el nombre colectivo de **anabolismo**. La compleja red de rutas catalizadas por enzimas, tanto catabólicas como anabólicas, constituye el **metabolismo** celular. El ATP (junto con los nucleósidos trifosfato energéticamente equivalentes que son citidina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP) y guanosina trifosfato (GTP)) es el nexo de unión entre los componentes anabólicos y catabólicos de esta red (lo que se muestra esquemáticamente en la **Fig. 1-30**). Las rutas de reacciones catalizadas enzimáticamente que actúan sobre los principales constituyentes de las células (proteínas, grasas, azúcares y ácidos nucleicos) son prácticamente idénticas en todos los organismos vivos.

El metabolismo está regulado para conseguir equilibrio y economía

Las células vivas no sólo sintetizan simultáneamente miles de clases diferentes de moléculas de glúcidos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos y sus subunidades más sencillas sino que además son capaces de hacerlo en las proporciones precisas que son necesarias para la célula en cualquier situación. Cuando, por ejemplo, se produce un crecimiento celular rápido, deben sintetizarse grandes cantidades de precursores de proteínas y ácidos nucleicos, mientras que en condiciones de no crecimiento la necesidad de estos precursores se encuentra muy reducida. Los enzimas clave de cada ruta metabólica están regulados de manera que cada tipo de molécula precursora se sintetiza en la cantidad adecuada a las necesidades de la célula en aquel momento.

Consideremos la ruta que da lugar en *E. coli* a la síntesis del aminoácido isoleucina, uno de los constituyentes de las proteínas. La ruta consta de cinco reacciones catalizadas por cinco enzimas diferentes (las letras A a F representan los intermediarios de la ruta):



Si una célula empieza a producir más isoleucina de la necesaria para la síntesis proteica, la isoleucina no utilizada se acumula y este incremento en la concentración inhibe la actividad catalítica del primer enzima de la ruta, con lo que se frena inmediatamente la producción de isoleucina. Esta **inhibición por retroalimentación** mantiene el equilibrio entre producción y utilización de cada intermediario metabólico. (A lo largo del libro usaremos el símbolo U para indicar inhibición de una reacción enzimática.)

A pesar de que sea útil para la organización y la comprensión del metabolismo, el concepto de rutas discretas constituye una simplificación. En la célula existen miles de intermediarios metabólicos, muchos de los cuales forman parte de más de una ruta. El metabolismo se representa mejor como una red de rutas interconectadas e interdependientes donde la variación en la concentración de cualquier metabolito da inicio a un efecto en cadena que influye en el flujo de materiales a través de otras rutas. La comprensión de estas complejas interacciones entre intermediarios y rutas en términos cuantitativos es una tarea enorme que puede parecer desalentadora, pero el impulso actual en la **biología de sistemas**, que se discute en el Capítulo 15, ha empezado a generar nuevos conocimientos sobre la regulación global del metabolismo.

Las células regulan también la síntesis de sus propios catalizadores, los enzimas, en respuesta al aumento o disminución en las necesidades de un producto metabólico; este tema se trata en el Capítulo 28. La expresión regulada de los genes (la traducción de la información del DNA en proteínas celulares activas) y la síntesis de los enzimas son otros niveles de control metabólico en la célula. Todos ellos deben ser tenidos en cuenta al describir el control global del metabolismo celular.

RESUMEN 1.3 Fundamentos físicos

- Las células vivas son sistemas abiertos que intercambian materia y energía con su entorno, extrayendo y canalizando energía para mantenerse en un estado estacionario dinámico distante del equilibrio. La energía se obtiene de la luz solar o de combustibles químicos convirtiendo la energía de un flujo electrónico en energía de los enlaces químicos del ATP.
- La tendencia de una reacción química a llegar al equilibrio puede expresarse como la variación en su energía libre, ΔG, que tiene dos componentes: variación de entalpía, ΔH, y variación de entropía, ΔS. Estas variables se relacionan entre ellas por la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.
- Cuando la ΔG de una reacción es negativa, la reacción es exergónica y tiende a llegar a su fin; cuando ΔG es positiva, la reacción es endergónica y tiende a avanzar en la dirección opuesta. Cuando dos reacciones se suman para dar lugar a una tercera reacción, la ΔG de la reacción global es la suma de las ΔG de las dos reacciones individuales.
- Las reacciones que convierten ATP en P_i y ADP o en AMP y PP_i son altamente exergónicas (ΔG negativa y de valor elevado). Muchas reacciones celulares endergónicas son posibles gracias al acoplamiento, a través de intermediarios comunes, con estas reacciones altamente exergónicas.
- La variación de energía libre estándar de una reacción, ΔG°, es una constante física relacionada con la constante de equilibrio mediante la ecuación $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$.
- La mayor parte de las reacciones celulares tienen lugar a velocidades útiles gracias a que existen enzimas que las catalizan. Los enzimas actúan en parte estabilizando el estado de transición, reduciendo la energía de activación, $\Delta G^\ddagger$, e incrementando la velocidad de reacción en muchos órdenes de magnitud. La actividad catalítica de los enzimas en las células está regulada.
- El metabolismo es la suma de muchas secuencias de reacciones interconectadas en las que se interconvierten metabolitos celulares. Cada secuencia está regulada de manera que produzca lo que la célula nece-



(a) (b)

FIGURA 1-31 Dos escrituras antiguas. (a) El Prisma de Senaquerib, inscrito aproximadamente en el 700 a. C., describe algunos hechos históricos acaecidos durante el reinado del rey Senaquerib en caracteres del lenguaje asirio. El Prisma contiene aproximadamente 20.000 caracteres, pesa 50 kg y ha sobrevivido prácticamente intacto durante 2.700 años. **(b)** La molécula única de DNA de la bacteria *E. coli*, que emerge hacia el exterior de la célula lisada, es centenares de veces más larga que la misma célula y contiene codificada toda la información necesaria para especificar la estructura y las funciones de la célula. El DNA bacteriano contiene aproximadamente 4,6 millones de caracteres (nucleótidos), pesa menos de 10^{-10} g y sólo ha sufrido cambios menores durante los últimos millones de años. (Los puntos amarillos y las manchas oscuras de la micrografía electrónica coloreada son artefactos de la preparación.) [Fuentes: (a) Erich Lessing/Art Resource, New York. (b) Dr. Gopal Murti-CNRI/Phototake New York.]

sita en cada momento y consuma sólo la energía necesaria para ello.

1.4 Fundamentos genéticos

Posiblemente, la propiedad más remarcable de las células y organismos vivos es su capacidad para reproducirse con fidelidad casi perfecta a lo largo de incontables generaciones. Esta continuidad de rasgos heredados implica que, a lo largo de millones de años, la estructura de las moléculas que contienen la información genética ha debido permanecer constante. Muy pocas huellas históricas de la civilización, incluidas las grabadas sobre cobre o talladas sobre piedra **(Fig. 1-31)**, han logrado sobrevivir más de un milenio. Pero existen pruebas convincentes de que las instrucciones genéticas de los organismos vivos han permanecido prácticamente inalteradas durante períodos mucho más largos; muchas bacterias tienen aproximadamente el mismo tamaño, forma y estructura interna que las que vivieron hace aproximadamente cuatro mil millones de años. Esta continuidad en estructura y composición es el resultado de la continuidad en la estructura del material genético.

Los descubrimientos de la naturaleza química y de la estructura tridimensional del material genético, **el ácido desoxirribonucleico o DNA**, son hitos trascendentales de la biología del siglo XX. La secuencia de sus subunidades monoméricas, los nucleótidos (o más exactamente, los desoxirribonucleótidos, como se verá más adelante) de este polímero lineal lleva codificadas las instrucciones para formar todos los demás componentes celulares y actúa además de molde para la producción de moléculas idénticas de DNA que serán distribuidas a la progenie al dividirse la célula. La perpetuación de una especie biológica exige que su información genética se mantenga estable, se exprese correctamente en forma de productos génicos y se reproduzca con un mínimo de errores. La eficacia en el almacenaje, la expresión y la reproducción del mensaje genético define a las especies individuales, las distingue de las demás y asegura su continuidad a lo largo de generaciones sucesivas.

La continuidad genética reside en las moléculas de DNA

El DNA es un polímero orgánico largo y delgado, una molécula peculiar que está construida a escala atómica en una dimensión (anchura) y a escala humana en la otra (longitud: una molécula de DNA puede medir muchos centímetros). Un espermatozoide o un óvulo humanos, que transportan la información hereditaria acumulada a lo largo de miles de millones de años de evolución, transmiten esta herencia en forma de moléculas de DNA en las que el mensaje genético está codificado en la secuencia lineal de las subunidades de nucleótido unidas covalentemente.

Cuando explicamos las propiedades de una especie química solemos describir el comportamiento medio de un número muy grande de moléculas idénticas. La predicción del comportamiento de una molécula individual en una cantidad de, por ejemplo, un picomol de un compuesto (aproximadamente 6×10^{11} moléculas) resulta difícil, pero es más sencillo predecir el comportamiento *promedio* de las moléculas gracias al gran número de ellas que es posible analizar al mismo tiempo. En este aspecto, el DNA celular es una notable excepción. El DNA que constituye el material genético completo de una célula de *E. coli* es una *única molécula* que contiene 4,64 millones de pares de nucleótidos. Esta única molécula debe replicarse perfectamente en todos sus detalles para que *E. coli* genere una progenie idéntica mediante la división celular; en este caso no es, por tanto, posible pensar en un comportamiento promedio, o estadístico. Lo mismo ocurre en todas las demás células. Un espermatozoide humano aporta al óvulo que fecunda una sola molécula de DNA en cada uno de los 23 cromosomas diferentes, que se combinan con una sola molécula de DNA en cada uno de los correspondientes cromosomas del óvulo. El resultado de esta unión es fácilmente predecible: un embrión que contiene la totalidad de sus ~25.000 genes, formado por 3 mil millones de pares de nucleótidos, e intacto. Una proeza química asombrosa.

EJEMPLO PRÁCTICO 1-6 Fidelidad de la replicación del DNA

Calcule el número de veces que se ha copiado el DNA de una célula de *E. coli* desde el momento de la aparición de su precursor bacteriano más ancestral hace aproximadamente 3.500 millones de años. Como simplificación considere que, en promedio, se ha producido una división celular cada 12 horas (esto constituye una sobreestimación para las bacterias modernas y probablemente una infraestimación para las más antiguas).

Solución:

(1 generación/12 horas)(24horas/día)(365días/año)$(3{,}5 \times 10^9$ años$)$
$= 2{,}6 \times 10^{13}$ generaciones.

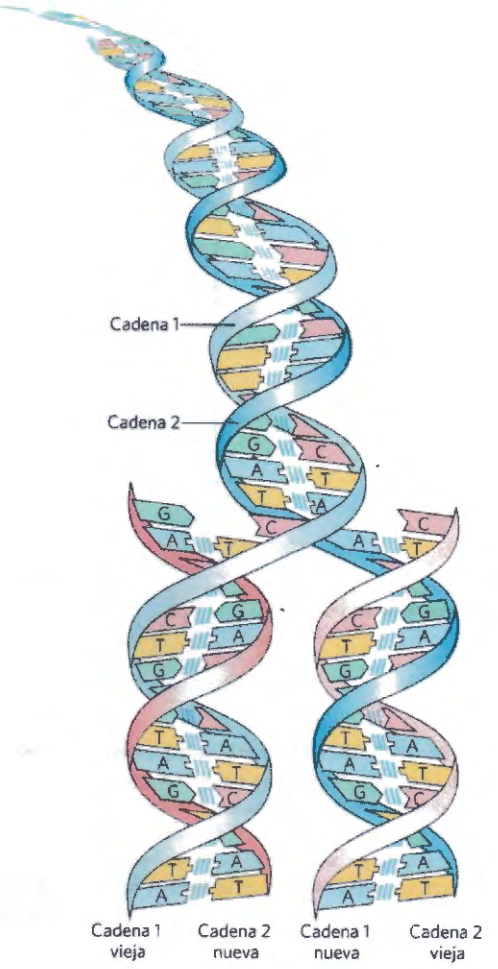


FIGURA 1-32 Complementariedad entre las dos cadenas del DNA. El DNA es un polímero lineal de cuatro tipos de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente: desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C) y desoxitimidilato (T). Cada uno de los nucleótidos, gracias a su precisa estructura tridimensional, puede asociarse muy específicamente, pero de modo no covalente, con otro de los nucleótidos en la cadena complementaria: A se asocia siempre T y G siempre con C. Así, en la molécula de DNA de doble cadena, la secuencia completa de nucleótidos de una hebra o cadena es *complementaria* con la secuencia de la otra. Las dos cadenas del DNA, unidas por enlaces de hidrógeno (representados aquí por líneas verticales azules) entre los pares de nucleótidos complementarios, se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice del DNA. En la replicación del DNA, las dos cadenas (en color azul) se separan y se sintetizan dos cadenas nuevas (en color rosa), cada una con una secuencia complementaria a la de una de las cadenas originales. El resultado son dos moléculas de doble hélice de DNA, cada una de ellas idéntica al DNA original.

Cada página de este libro contiene unos 5.000 caracteres por lo que el libro completo contiene unos 5 millones de caracteres. El cromosoma de *E. coli* también contiene unos 5 millones de caracteres (pares nucleotídicos). Imagínese haciendo una copia a mano de este libro, pasándolo a un compañero de clase para que a su vez lo copie a mano y dé esta segunda copia a un tercer compañero que haría una tercera copia **y así sucesivamente**. ¿Se parecería mucho cada copia sucesiva del libro al original? ¡Imagine el libro de texto que se obtendría como resultado de la copia manual de este libro unos cuantos billones de veces!

La estructura del DNA hace posible su replicación y reparación con fidelidad casi perfecta

La capacidad de las células vivas de preservar su material genético y duplicarlo para su transmisión a la generación siguiente es el resultado de la complementariedad estructural entre las dos cadenas de la molécula de DNA **(Fig. 1-32)**. La unidad básica del DNA es un polímero lineal formado por cuatro subunidades monoméricas diferentes, los **desoxirribonucleótidos**, ordenados en una secuencia lineal precisa. En esta secuencia lineal se encuentra codificada la información genética. Dos de estas cadenas poliméricas se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice de DNA, en la que cada desoxirribonucleótido de una cadena queda específicamente aparejada con un desoxirribonucleótido complementario de la cadena opuesta. Antes de producirse la división celular, las dos cadenas de DNA se separan y actúan de molde para la síntesis de otra cadena complementaria nueva, con lo que se generan dos moléculas de doble hélice idénticas, una para cada célula hija. Si una cadena resultase dañada, la continuidad de la información queda asegurada por la información presente en la cadena complementaria, que actuará de molde para la reparación de la lesión.

La secuencia lineal del DNA codifica proteínas con estructuras tridimensionales

La información está codificada en el DNA en su secuencia lineal (monodimensional) de unidades desoxirribonucleotídicas, pero la expresión de esta información da como resultado una célula tridimensional. La transición entre una y tres dimensiones ocurre en dos fases. Una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos del DNA codifica (a través de un intermediario, el RNA) la producción de una proteína con la correspondiente secuencia lineal, en este caso de aminoácidos **(Fig. 1-33)**. La proteína se pliega adoptando una estructura tridimensional particular, determinada por su secuencia de aminoácidos y estabilizada principalmente por interacciones no covalentes. Aunque la forma final de la proteína plegada viene dictada por su secuencia de aminoácidos, el proceso de plegamiento recibe la asistencia de "chaperonas moleculares" (véase la Fig. 4-30). La adopción de una estructura tridimensional precisa, o **conformación nativa** por parte de la proteína es crucial para su función.

Una vez que la proteína ha adoptado su conformación nativa, puede asociarse de modo no covalente con otras macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos o lípidos) para formar complejos supramoleculares como cromosomas, ribosomas y membranas. Las moléculas individuales de estos complejos poseen sitios de unión específicos y de alta afinidad para las demás y son capaces de formar espontáneamente complejos funcionales en el medio celular.

A pesar de que las secuencias de aminoácidos de las proteínas contienen toda la información necesaria para alcanzar su estado nativo, también es necesario un entorno celular adecuado (de pH, fuerza iónica, concentración de iones metálicos, etc.) para que el plegamiento y formación de los complejos sean correctos. Por

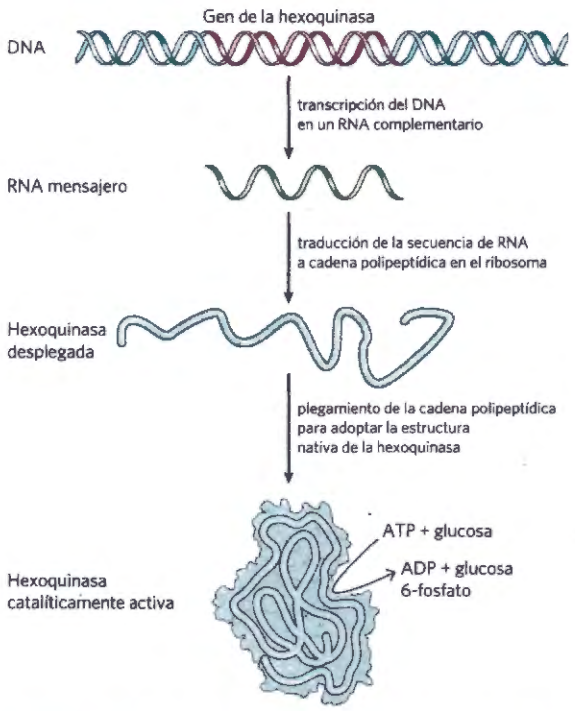


FIGURA 1-33 Del DNA al RNA a la proteína al enzima (hexoquinasa). La secuencia lineal de desoxirribonucleótidos del DNA (el gen) que codifica la proteína hexoquinasa se transcribe primero en una molécula de ácido ribonucleico (RNA) con secuencia de ribonucleótidos complementaria. La secuencia de RNA (RNA mensajero) se traduce posteriormente en la cadena lineal de la proteína de la hexoquinasa, que se pliega para adoptar su conformación tridimensional nativa, a menudo con la ayuda de las chaperonas moleculares. Una vez adoptada su forma nativa, la hexoquinasa adquiere su capacidad catalítica: puede catalizar la fosforilación de la glucosa usando ATP como donador del grupo fosforilo.

tanto, la secuencia del DNA no es capaz por sí sola de formar y mantener una célula plenamente funcional.

RESUMEN 1.4 Fundamentos genéticos

- La información genética está codificada en la secuencia lineal de cuatro tipos de desoxirribonucleótidos en el DNA.
- La molécula de la doble hélice del DNA contiene un molde interno que permite su propia replicación y reparación.
- Las moléculas de DNA son extraordinariamente grandes, con masas moleculares de millones o de miles de millones.
- A pesar del enorme tamaño del DNA, su secuencia de nucleótidos es muy precisa y el mantenimiento de una secuencia exacta durante un largo período de tiempo constituye la base de la continuidad genética de los organismos
- La secuencia lineal de aminoácidos de una proteína, codificada en el DNA del gen de esa proteína, da lugar a una estructura tridimensional que es exclusiva para esa proteína, un proceso que depende también de las condiciones ambientales.
- Ciertas macromoléculas individuales con afinidad específica para con otras macromoléculas se unen entre sí formando complejos supramoleculares.

1.5 Fundamentos evolutivos

Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución.

—*Theodosius Dobzhansky*, The American Biology Teacher, *Marzo 1973*

Los grandes progresos de la bioquímica y la biología molecular durante las últimas décadas han confirmado ampliamente la validez de la contundente generalización de Dobzhansky. La notable similitud de las vías metabólicas y las secuencias génicas en los tres dominios de la vida es un robusto argumento a favor de la hipótesis de que todos los organismos modernos descienden de un progenitor evolutivo común a través de una serie de pequeños cambios (mutaciones), que conferían, en cada caso, una ventaja selectiva a un organismo dado en un nicho ecológico concreto.

Los cambios en las instrucciones hereditarias hacen posible la evolución

A pesar de la fidelidad casi perfecta de la replicación genética, ciertos errores muy poco frecuentes que no han sido reparados durante la replicación del DNA producen variaciones en la secuencia nucleotídica del DNA, dando lugar a una **mutación** que cambia las instrucciones para alguno de los componentes celulares. Una reparación incorrecta de una lesión en una de las cadenas de DNA tiene el mismo efecto. Las mutaciones en el DNA que se transmite a los descendientes, es decir, mutaciones en las células reproductoras, pueden ser dañinas o incluso letales para el nuevo organismo o célula; pueden, por ejemplo, provocar la síntesis de un enzima defectuoso incapaz de catalizar una reacción metabólica esencial. Sin embargo, una mutación puede dar lugar ocasionalmente a un organismo o una célula *mejor* preparados para sobrevivir en su entorno natural **(Fig. 1-34)**. El enzima mutante podría, por ejemplo, haber adquirido una especificidad ligeramente diferente que lo hiciera capaz de utilizar cierto compuesto que la célula era incapaz de metabolizar antes de producirse la mutación. Si una población de células se encontrase en un entorno en el que este compuesto fuera el único o el más abundante de los nutrientes disponibles, la célula mutante tendría ventajas selectivas sobre las otras células no mutantes (de **tipo silvestre – *wild type***) de la población. La célula mutante y su progenie sobrevivirían y prosperarían en el nuevo entorno mientras que las células del tipo silvestre no dispondrían de nutrientes y perecerían. Este es el significado que Darwin quiso dar a la selección natural, lo que, a veces, se conoce como "la supervivencia del más adaptado".

En ocasiones se produce la duplicación de un gen entero en el cromosoma como resultado de una replicación defectuosa del mismo. La segunda copia es superflua, con lo que las mutaciones que se produzcan en este segundo gen no serán nocivas; ésta constituye otra forma de evolución celular puesto que implica la producción de un nuevo gen con una nueva función al tiempo que se retienen el gen y la función originales. Desde este punto de vista, las moléculas de DNA de los organismos modernos son como documentos históricos llenos de datos que hablan del largo viaje entre las primeras células y los organismos actuales. Sin embargo,

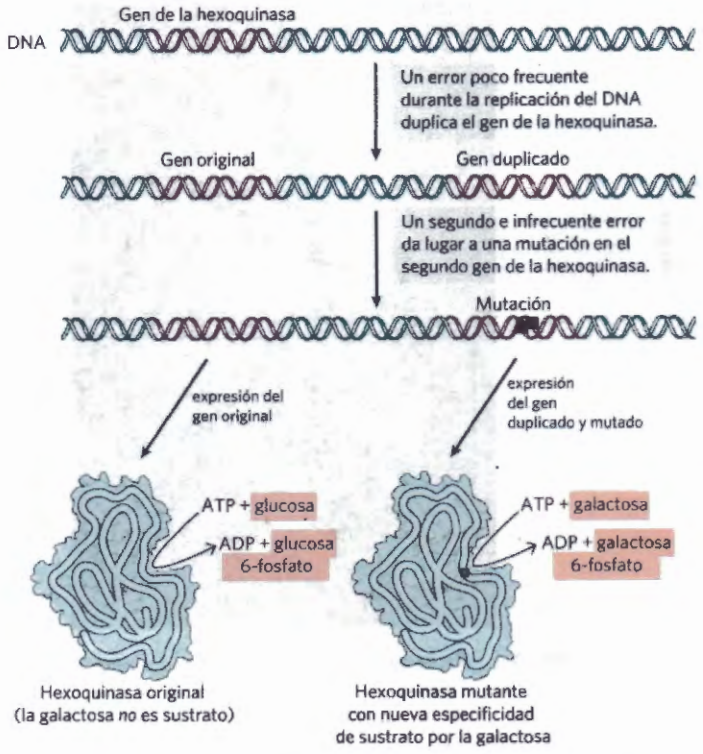


FIGURA 1-34 Duplicación génica y mutación: una vía para generar actividades enzimáticas nuevas. En este ejemplo, el gen único de la hexoquinasa de un organismo hipotético podría ser copiado accidentalmente dos veces durante la replicación del DNA, de modo que el organismo acabara teniendo dos copias del gen, una de ellas superflua. A lo largo de muchas generaciones, y a causa de la repetida duplicación del DNA con dos genes de hexoquinasa, se producen errores que, a pesar de su baja frecuencia, dan lugar a cambios en el gen superfluo y, por tanto, en la proteína que codifica. En unos pocos casos raros, la proteína producida por este gen mutante se altera de forma que puede unirse a un nuevo sustrato, galactosa en nuestro caso hipotético. La célula que contiene el gen mutante ha adquirido una capacidad nueva (metabolismo de la galactosa), que le puede permitir sobrevivir en un nicho ecológico en el que exista suministro de galactosa pero no de glucosa. Si no se produce duplicación génica previamente a la mutación se pierde la función original del gen.

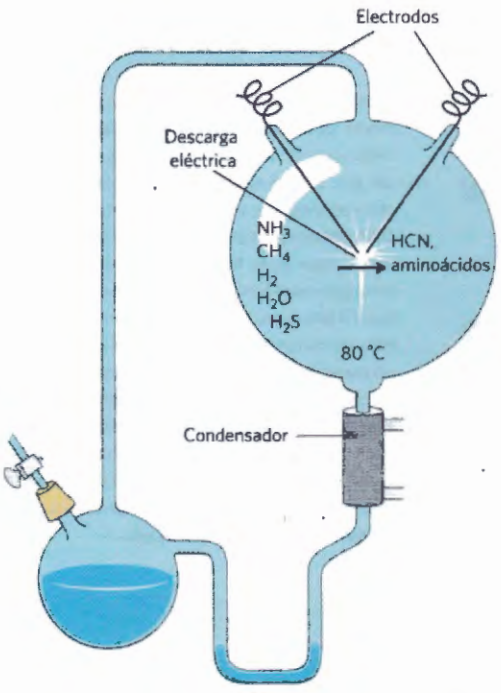
los datos históricos contenidos en el DNA no son completos; a lo largo de la evolución se han borrado muchas de las mutaciones, o se ha escrito sobre ellas tachándolas. A pesar de ello, las moléculas de DNA son la mejor fuente de historia biológica disponible. La frecuencia real de errores en la replicación del DNA es fruto del equilibrio entre un número excesivo de errores, que convertirían en no viables a las células hija, y demasiado pocos, que harían imposible la variación genética que permite la supervivencia de las células mutantes en nuevos nichos ecológicos.

Varios miles de millones de años de selección adaptativa han conducido al refinamiento de los sistemas celulares, haciéndolos capaces de obtener el máximo provecho de las propiedades físicas y químicas de los materiales crudos del entorno. Las variaciones genéticas producidas al azar entre individuos de una población, combinadas con la selección natural, han generado la evolución de la enorme variedad actual de organismos, cada uno de ellos adaptado a su nicho ecológico particular.

Las primeras biomoléculas aparecieron por evolución química

En nuestros comentarios anteriores hemos pasado por alto el primer capítulo de la historia de la evolución: la aparición de la primera célula viva. Aparte de su presencia en los organismos vivos, los compuestos orgánicos, entre los que se incluyen las biomoléculas básicas tales como los aminoácidos y los glúcidos, se encuentran presentes únicamente en muy pequeñas cantidades en la corteza terrestre, el mar y la atmósfera. ¿Cómo adquirieron los primeros organismos vivos sus componentes estructurales orgánicos característicos? Existe una hipótesis que sostiene que estos compuestos se crearon como consecuencia de la acción de poderosas fuerzas ambientales –irradiación ultravioleta, relámpagos o erupciones volcánicas – sobre los gases existentes en la atmósfera prebiótica de la Tierra y sobre los compuestos inorgánicos disueltos en los respiraderos hidrotérmicos de los fondos oceánicos.

Esta hipótesis fue puesta a prueba en un experimento clásico sobre el origen abiótico (no biológico) de las biomoléculas orgánicas realizado en 1953 por Stanley Miller en el laboratorio de Harold Urey. Miller sometió mezclas gaseosas similares a las que se presumía que existían en la Tierra prebiótica y que incluían NH_3, CH_4, H_2O y H_2 a descargas eléctricas producidas por un par de electrodos (con el fin de simular las descargas de un relámpago) durante periodos iguales o superiores a una semana y a continuación analizó el contenido del recipiente de reacción que se había mantenido cerrado **(Fig. 1-35)**. La fase gaseosa de la mezcla resultante contenía CO y CO_2 además de los gases iniciales. La fase acuosa contenía una mezcla de compuestos orgánicos entre los que se incluían algunos aminoácidos, hidroxiácidos, aldehídos y ácido cianhídrico (HCN). Este experimento demostró que la producción abiótica de biomoléculas era posible en tiempos relativamente cortos y en condiciones relativamente suaves. Cuando las muestras cuidadosamente conservadas por Miller y redescubiertas en 2010 se examinaron con técnicas mucho más sensibles y eficientes (cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas), se confirmaron, ampliándolas muchísimo, sus observaciones originales. Experimentos previamente no publicados por Miller en los que se había añadido H_2S a la mezcla de gases (para mimetizar las columnas volcánicas "humeantes" del fondo marino; **Fig. 1-36**) demostraron la formación de 23 aminoácidos, 7 compuestos organosulfurados y una gran cantidad de compuestos más simples que podrían



(a)



(b)

FIGURA 1-35 Producción abiótica de biomoléculas. **(a)** Aparato de descargas eléctricas del tipo utilizado por Miller y Urey en los experimentos en que demostraron la formación abiótica de compuestos orgánicos en condiciones atmosféricas primitivas. Después de someter el contenido gaseoso del sistema a descargas eléctricas se recogieron los productos por condensación. Entre esos productos se encontraron biomoléculas como los aminoácidos. **(b)** Stanley L. Miller (1930-2007) usando su aparato de descargas eléctricas. [Fuente: Bettman/Corbis.]

haber actuado como bloques estructurales en la evolución prebiótica.

Experimentos de laboratorio más refinados han probado que en estas condiciones se pueden formar muchos de los componentes químicos de las células vivas, incluidos polipéptidos y moléculas parecidas al RNA. Los polímeros de RNA pueden actuar como catalizadores en reacciones biológicas importantes (véanse los Capítulos 26 y 27), por lo que es posible que el RNA jugara un papel crucial en la evolución prebiótica gracias a su doble capacidad como catalizador y como depositario de información. Las unidades monoméricas del RNA, los ribonucleótidos, no se han podido obtener en condiciones prebióticas en el laboratorio, por lo que es posible que la evolución prebiótica no empezara con el mismo RNA sino con una molécula parecida.

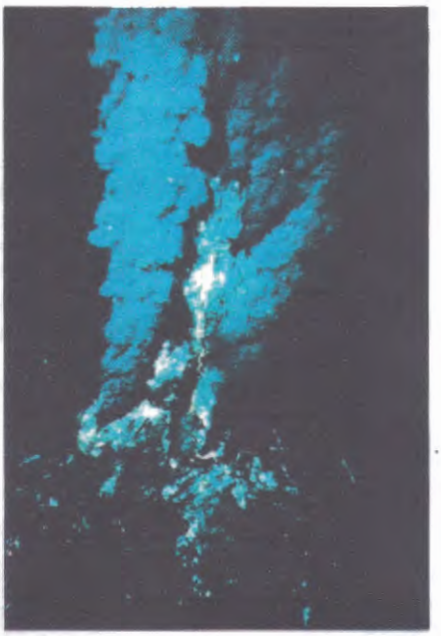


FIGURA 1-36 Fumarolas negras. Los respiradores hidrotermales del fondo marino emiten agua supercalentada rica en minerales disueltos. Cuando la solución expulsada se encuentra con el agua fría, precipitan los sulfuros disueltos y se forma un "humo" negro. En la inmediata vecindad de estos respiraderos, que pueden haber sido el sitio donde se produjo la biogénesis primigenia, se encuentran diversas formas de vida entre las que se incluyen arqueas y algunos animales multicelulares sorprendentemente complejos. [Fuente: (a) P. Rona/OAR/National Undersea Research Program (NURP), NOAA.]

Los primeros genes y catalizadores podrían haber sido moléculas de RNA o precursores relacionados

En los organismos modernos, los ácidos nucleicos codifican la información genética que especifica la estructura de los enzimas, mientras que los enzimas poseen la capacidad de catalizar los procesos de replicación y reparación de los ácidos nucleicos. La mutua dependencia de estas dos clases de biomoléculas hace que surja una duda desconcertante ¿Quien apareció primero, el DNA o las proteínas?

La respuesta podría bien ser que aparecieron al mismo tiempo y que el RNA precedió a los dos. El descubrimiento de que las moléculas de RNA pueden actuar como catalizadores de su propio proceso de formación sugiere que el RNA pudo haber sido a la vez el primer gen *y* el primer catalizador biológico. En base a esta idea **(Fig. 1-37)**, una de las primeras etapas de la evolución biológica habría sido la formación al azar de una molécula de RNA con capacidad para catalizar la formación de otras moléculas de RNA con la misma secuencia: una molécula de RNA autorreplicante y autoperpetuante. La concentración de moléculas de RNA autorreplicantes se incrementaría exponencialmente al formarse varias moléculas a partir de una, muchas más a partir de éstas y así sucesivamente. Es presumible que la fidelidad de la reproducción estaba lejos de ser perfecta, de modo que el proceso permitiría la generación de variantes de la molécula de RNA, algunas de las cuales serían probablemente más eficaces en su autorreplicación. En la competencia por la utilización de los

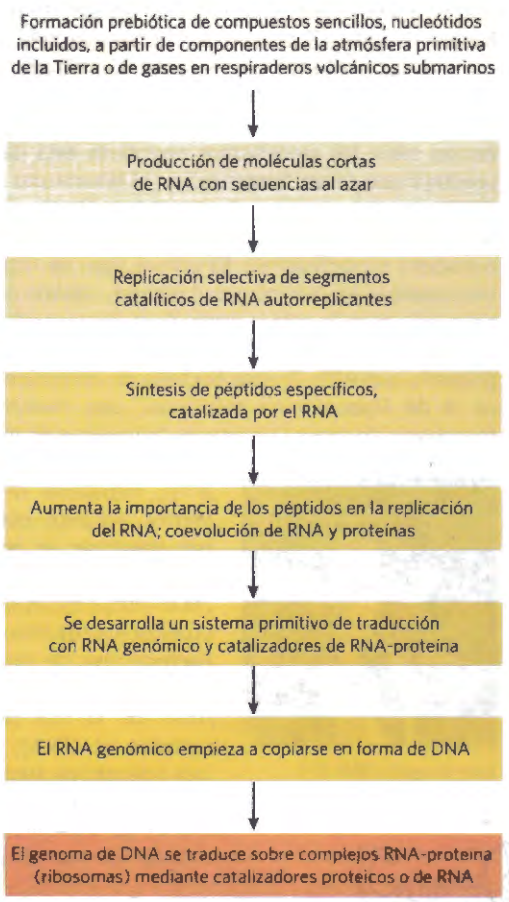


FIGURA 1-37 **La posible situación en un "mundo de RNA".**

nucleótidos, las secuencias autorreplicantes más eficientes saldrían más beneficiadas, mientras que las menos eficientes desaparecerían del medio.

De acuerdo con la hipótesis del "mundo del RNA", la división de funciones entre el DNA (almacenamiento de la información genética) y las proteínas (catálisis) se produjo en una etapa más tardía. Con anterioridad se desarrollaron nuevas variantes de moléculas de RNA autorreplicantes que poseían la capacidad adicional de catalizar la condensación de aminoácidos en forma de péptidos. En ocasiones, los péptidos así formados habrían sido capaces de potenciar la capacidad autorreplicante del RNA, y el conjunto molécula de RNA-péptido colaborador podría haber sufrido más variaciones secuenciales que hubieran generado sistemas autorreplicantes cada vez más eficientes. El importante descubrimiento de que en la maquinaria encargada de la síntesis de proteínas de las células modernas (ribosomas) son las moléculas de RNA, y no las de proteína, las que catalizan la formación del enlace peptídico, está de acuerdo con la hipótesis del mundo de RNA.

Cierto tiempo después de la evolución de este primitivo sistema de síntesis de proteínas se produjo otro avance: aparecieron moléculas de DNA con secuencias complementarias a las de RNA autorreplicante, que reemplazaron a estas últimas en la función de conservar la información "genética", mientras que las moléculas de RNA evolucionaron para actuar en la síntesis de proteínas. (En el Capítulo 8 se explica la razón de que el DNA sea una molécula más estable que el RNA y, por tanto, un mejor depositario de la información hereditaria). Las proteínas demostraron poder comportarse como catalizadores versátiles y asumieron con el tiempo esta función de manera mayoritaria. Los compuestos lipídicos de la sopa primordial pudieron formar capas relativamente impermeables alrededor de grupos de moléculas autorreplicantes. La concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el interior de estos compartimientos lipídicos favoreció las interacciones moleculares necesarias para los procesos de autorreplicación.

La hipótesis del mundo de RNA es intelectualmente satisfactoria pero deja sin contestar una pregunta intrigante: ¿De dónde procedían los nucleótidos necesarios para construir las primeras moléculas de RNA? Una alternativa a esta hipótesis del mundo de RNA propone la evolución previa de rutas metabólicas simples, quizás en las fuentes hidrotermales del fondo oceánico. Una serie de reacciones encadenadas habría producido allí precursores, entre los que se contaban los nucleótidos, antes de la aparición de las membranas lipídicas o el RNA. En ausencia de datos experimentales más sólidos, ninguna de estas dos hipótesis es descartable.

La evolución biológica empezó hace más de tres mil quinientos millones de años

La Tierra se formó hace aproximadamente 4.600 millones de años, y la primera prueba concluyente de la existencia de vida data de hace más de 3.500 millones de años. En 1996, científicos que trabajaban en Groenlandia encontraron pruebas químicas de vida ("moléculas fósiles") de una antigüedad de unos 3.850 millones de años y consistentes en formas de carbono incrustadas en roca que parecían tener un origen claramente biológico. Durante sus primeros mil millones de años de vida, apareció en algún lugar de la Tierra el primer organismo simple, capaz de replicar su propia estructura a parir de un molde (¿RNA?) que fue el primer material genético. Dado que en los tiempos del amanecer de la vida la atmósfera terrestre carecía prácticamente de oxígeno y además existían pocos organismos que pudieran consumir los compuestos orgánicos formados mediante procesos naturales, éstos eran relativamente estables. Con esta estabilidad y eones de tiempo, lo improbable acabó volviéndose inevitable: vesículas lipídicas que contenían compuestos orgánicos y moléculas de RNA autorreplicantes dieron lugar a las primeras células (proteocélulas), y las proteocélulas con mayor capacidad de autorreplicación se hicieron más numerosas. El proceso de evolución biológica había empezado.

La primera célula utilizó probablemente combustibles inorgánicos

Las primeras células aparecieron en una atmósfera reductora (no había oxígeno) y, probablemente, obtuvieron la energía de combustibles inorgánicos tales como el sulfuro ferroso o el carbonato ferroso, ambos muy abundantes en la Tierra primitiva. Por ejemplo, la reacción

$$FeS + H_2S \rightarrow FeS_2 + H_2$$

proporciona energía suficiente para impulsar la síntesis de ATP y compuestos similares. Los compuestos orgáni-

cos que requerían estas células podrían haber aparecido como consecuencia de la acción no biológica de las tormentas eléctricas, de la actividad volcánica o de los respiraderos hidrotermales de los océanos sobre componentes de la atmósfera primitiva de la tierra como el CO, el CO_2, el N_2, el NH_3 el CH_4 y otros. Se ha propuesto una fuente alternativa de compuestos orgánicos: el espacio extraterrestre. Las misiones espaciales de 2006 (Stardust) y 2014 (Philae) han descubierto que las partículas de polvo de un cometa contenían el aminoácido simple glicina y otros 20 compuestos orgánicos capaces de reaccionar para formar biomoléculas.

Los primeros organismos unicelulares fueron adquiriendo gradualmente la capacidad de obtener energía a partir de compuestos de su entorno y de utilizar esa energía para sintetizar una cantidad creciente de sus propias moléculas precursoras para ser menos dependientes de fuentes externas. Un acontecimiento evolutivo muy significativo fue el desarrollo de pigmentos capaces de capturar la luz visible del sol y usar su energía en la reducción o "fijación" del CO_2 para producir compuestos orgánicos más complejos. Es probable que el donador de electrones original para estos procesos **fotosintéticos** fuera el H_2S, que genera azufre elemental o sulfato (SO_4^{2-}) como productos secundarios. Algunos respiraderos hidrotérmicos del fondo de los mares (fumarolas negras; Fig. 1-36) emiten cantidades significativas de H_2, que es otro posible donador de electrones en el metabolismo de los organismos primitivos. Posteriormente, otras células desarrollaron la capacidad enzimática de utilizar H_2O como dador de electrones en las reacciones fotosintéticas, produciendo O_2 como producto de desecho. Las cianobacterias son los descendientes modernos de estos productores fotosintéticos de oxígeno primitivos.

Dado que la atmósfera de la Tierra prácticamente no contenía oxígeno en las primeras fases de la evolución biológica, las células primitivas eran anaeróbicas. En estas condiciones, los quimiótrofos podían oxidar compuestos orgánicos a CO_2 sin transferir electrones al O_2 sino a aceptores como el SO_4^{2-} dando, en este caso, H_2S como producto. Con la aparición de las bacterias fotosintéticas productoras de O_2, la atmósfera fue enriqueciéndose progresivamente en oxígeno, un oxidante poderoso y un veneno mortal para los organismos anaeróbicos. Respondiendo a la presión evolutiva, lo que Lynn Margulis y Dorion Sagan han llamado el "holocausto del oxígeno", algunas familias de microorganismos dieron lugar a organismos aeróbicos que obtenían su energía mediante el transporte de electrones desde moléculas de combustible hacia el oxígeno. Gracias a que las transferencias de electrones desde moléculas orgánicas al O_2 desprenden mucha energía, los organismos aeróbicos disfrutaron de ventajas energéticas sobre los anaeróbicos cuando ambos competían en un ambiente que contenía oxígeno. Esta ventaja dio como resultado el predominio de los organismos aeróbicos en ambientes ricos en O_2.

Las bacterias y arqueas actuales habitan en la práctica totalidad de nichos ecológicos de la biosfera, y existen organismos capaces de usar casi todos los tipos de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Los microbios fotosintéticos de aguas dulces y saladas captan la energía solar y la utilizan en la formación de glúcidos y todos los demás compuestos celulares los cuales, a su vez, son utilizados como alimento por otras formas de vida. El proceso evolutivo continúa y, en el caso de las bacterias de reproducción rápida, en una escala de tiempo que prácticamente nos permite observarlo en el laboratorio. Una línea interesante de investigación sobre los mecanismos evolutivos está dirigida a producir una célula "sintética" en el laboratorio (entendiendo por tal aquella en la que el investigador ha aportado todos sus componentes a partir de componentes conocidos y purificados). El primer paso en esta dirección consiste en determinar el número mínimo de genes necesario para la vida a partir de la observación de los genomas de las bacterias más sencillas. El genoma más pequeño conocido de una bacteria de crecimiento libre es el de *Mycoplasma mycoides*, que contiene 1,08 megapares de bases (1 megapar de bases es un millón de pares de bases). En el año 2010, científicos del Craig Venter Institute consiguieron sintetizar un cromosoma entero de un micoplasma in vitro e incorporar este cromosoma sintético en una bacteria viva de otra especie, *Mycoplasma capricolum* (de la que se había extraído el DNA), con lo que esta última adquirió las propiedades de *M. mycoides* **(Fig. 1-38)**. Esta tecnología abre el camino a la producción de una célula sintética que contenga la mínima cantidad de genes esenciales para la vida. Con una célula así podríamos esperar que fuera posible el estudio en el laboratorio de los procesos evolutivos mediante los que las protocélulas se diversificaron gradualmente y llegaron a ser más complejas.



Lynn Margulis, 1938-2011 [Fuente: Ben Barnhart/UMass Magazine.]

Las células eucarióticas evolucionaron a partir de precursores más simples a través de diversas fases

A partir de hace aproximadamente 1.500 millones de años, el registro fósil empieza a mostrar pruebas de la existencia de organismos mayores y más complejos, probablemente las primeras células eucarióticas **(Fig. 1-39)**.



FIGURA 1-38 Células sintéticas. Estas células se generaron mediante inyección del DNA de *Mycoplasma mycoides* sintetizado en el laboratorio en la célula enucleada de un organismo relacionado, *Mycoplasma capricolum*. Las células sintéticas se reproducen y tienen propiedades específicas de *M. mycoides*. [Fuente: © 2012 National Center for Microscopy & Imaging Research.]

No es posible deducir detalles acerca de los pasos evolutivos desde células no nucleadas a células nucleadas únicamente a partir del registro fósil, pero la comparación morfológica y bioquímica de los organismos modernos sugiere la existencia de una secuencia de acontecimientos consistente con los datos del registro fósil.

A lo largo del proceso deben haberse producido tres cambios principales. En primer lugar, al ir adquiriendo las células mayor cantidad de DNA, se perfeccionaron los mecanismos necesarios para su plegamiento en complejos discretos con proteínas específicas y para su división equitativa entre células hijas durante la división celular. Fueron necesarias proteínas especializadas para la estabilización del DNA plegado y para la segregación de los complejos proteína-DNA resultantes (*cromosomas*) durante la división celular. En segundo lugar, al aumentar el tamaño de las células, se desarrolló un sistema de membranas intracelulares que incluye una membrana doble que rodea al DNA. Esta membrana segrega el proceso nuclear de síntesis de RNA a partir de un molde de DNA del proceso citoplasmático de la síntesis de proteínas en los ribosomas. Finalmente, de acuerdo con una hipótesis ahora plenamente aceptada y avanzada (no sin mucha resistencia inicial) por Lynn Margulis, las células eucarióticas primitivas, incapaces de llevar a cabo la fotosíntesis o de usar metabolismo aeróbico, envolvieron bacterias aeróbicas o fotosintéticas para formar asociaciones **endosimbióticas** que, finalmente, se convirtieron en permanentes **(Fig. 1-40)**. Algunas bacterias aeróbicas evolucionaron para dar lugar a las mitocondrias de los eucariotas modernos y algunas cianobacterias fotosintéticas se convirtieron en plástidos, como los cloroplastos de las algas verdes, probables ancestros de las modernas células vegetales.

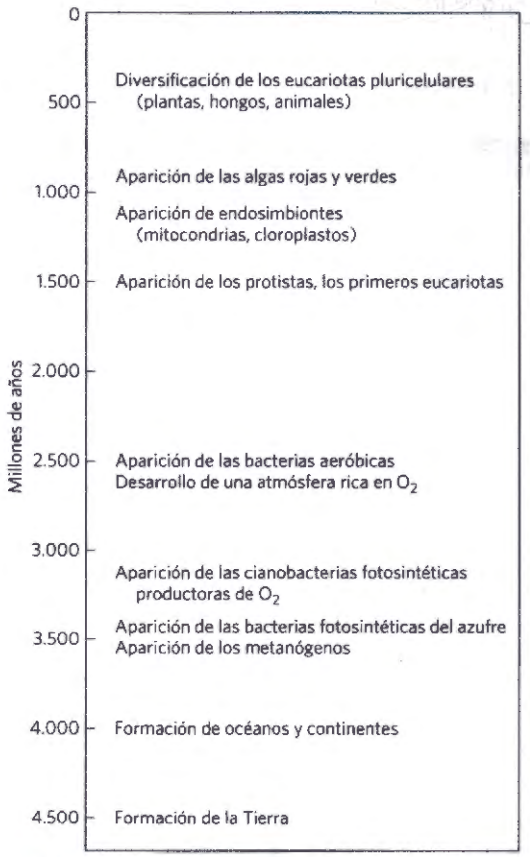


FIGURA 1-39 Momentos principales en la evolución de la vida en la Tierra.

En alguna fase posterior de la evolución, los organismos unicelulares descubrieron las ventajas de la asociación, que les permitió adquirir mayor movilidad, eficiencia y éxito reproductivo que sus competidores unicelulares. La evolución posterior de estos organismos organizados en grupos dio lugar a asociaciones permanentes entre células individuales y, finalmente, a la especialización en el seno de la colonia, es decir, a la diferenciación celular.

Las ventajas de la especialización celular impulsaron la evolución de organismos cada vez más complejos y altamente diferenciados, en los que ciertas células llevaban a cabo las funciones sensoriales, otras las funciones digestivas, fotosintéticas o reproductivas y así sucesivamente. Muchos de los organismos multicelulares modernos contienen centenares de tipos celulares distintos, cada uno de ellos especializado en alguna función necesaria para el organismo en su conjunto. Los mecanismos fundamentales que aparecieron inicialmente han seguido un proceso de refinamiento y mejora a lo largo de la evolución. En el movimiento de los cilios del *Paramecium* y de los flagelos de *Chlamydomonas* subyacen las mismas estructuras y mecanismos empleados en, por ejemplo, las altamente diferenciadas células espermáticas de los vertebrados.

La anatomía molecular revela relaciones evolutivas

Los bioquímicos disponen actualmente de un creciente y enormemente rico repertorio de información sobre la anatomía molecular de las células con el que analizar las relaciones evolutivas y refinar la teoría de la evolución. Se ha determinado la secuencia completa del **genoma**, la información genética completa de un organismo, de varios miles de bacterias y arqueas y de un número creciente de microorganismos eucarióticos tales como *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Plasmodium*; de plantas como *Arabidopsis thaliana* y arroz; y también de animales multicelulares como *Caenorhabditis elegans* (un gusano), *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre), el ratón, la rata el perro, el chimpancé y *Homo sapiens* (Tabla 1-2). Resulta incluso posible recuperar muestras de DNA de los tejidos de animales extintos como el hombre de Neanderthal o el mamut lanudo y secuenciarlas (vea el Capítulo 8). Gracias a la disponibilidad de estas secuencias se pueden establecer comparaciones detalladas y cuantitativas entre especies que permiten profundizar en el conocimiento del proceso evolutivo. Hasta ahora, la filogenia molecular derivada de las secuencias génicas es consistente con la filogenia clásica basada en estructuras macroscópicas, y en muchos casos es más precisa. La unidad de la vida a nivel molecular es evidente a pesar de la continua divergencia de los organismos a nivel anatómico; las estructuras y los mecanismos moleculares son marcadamente similares entre los organismos más simples y los más complejos. Es a nivel de las secuencias donde estas similitudes se aprecian mejor, ya sea en las secuencias del DNA que codifica las proteínas o en las secuencias de las proteínas mismas.

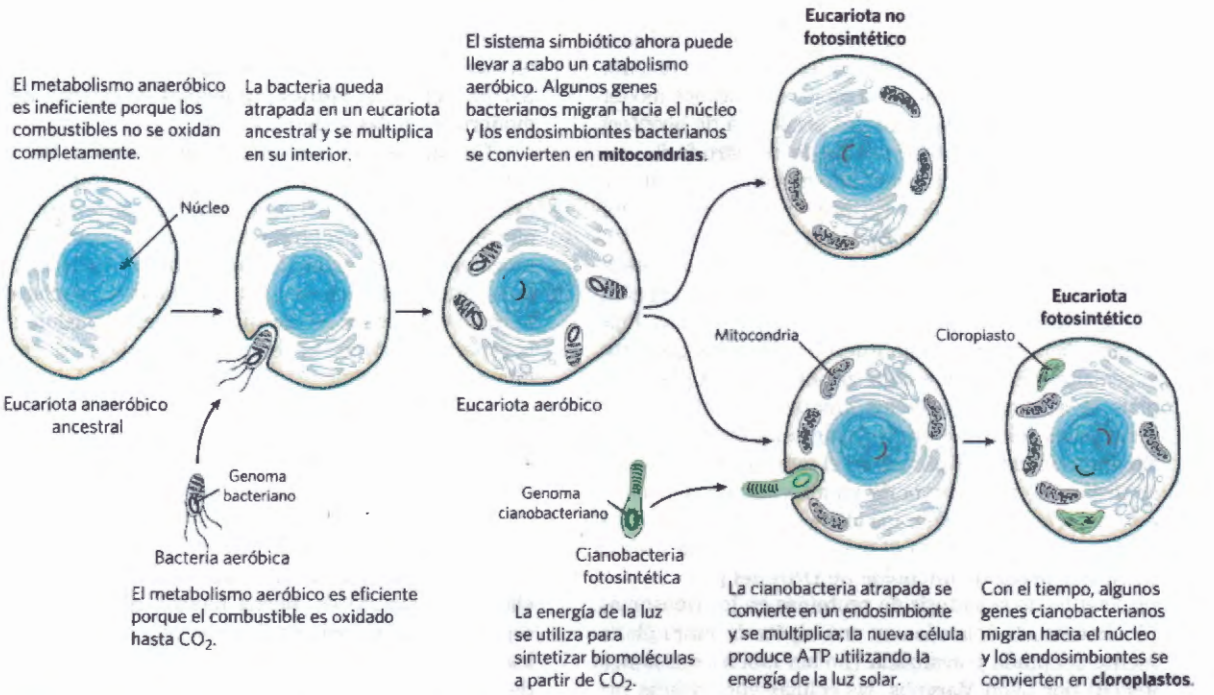


FIGURA 1-40 Evolución de los eucariotas mediante endosimbiosis. La célula eucariótica original, un anaerobio, asimiló bacterias púrpura endosimbióticas que poseían la capacidad de llevar a cabo catabolismo aeróbico y se convirtieron, con el paso del tiempo, en mitocondrias. Cuando las cianobacterias fotosintéticas se convirtieron también en endosimbióticas de algunos eucariotas aeróbicos, estas células se convirtieron en los precursores fotosintéticos de las algas verdes y plantas modernas.

Cuando dos genes comparten secuencias muy similares (secuencia de nucleótidos en el DNA o secuencias de aminoácidos en las proteínas codificadas) fácilmente detectables, se dice que sus secuencias son homólogas y que las proteínas que codifican son **homólogos**. Si una *misma* especie contiene dos genes homólogos, estos dos genes y sus productos proteicos se denominan **parálogos**. Se piensa que los genes parálogos han apa-

TABLA 1-2 Algunos de los muchos organismos cuyos genomas han sido secuenciados completamente

Organismo	Tamaño del genoma (pares de nucleótidos)	Interés biológico
Nanoarchaeum equitans	$4{,}9 \times 10^5$	Arquea marina simbiótica
Mycoplasma genitalium	$5{,}8 \times 10^5$	Bacteria parasitaria
Helicobacter pylori	$1{,}6 \times 10^6$	Produce úlceras gástricas
Methanocaldococcus jannaschii	$1{,}7 \times 10^6$	Arquea; crece a 85°C
Haemophilus influenzae	$1{,}9 \times 10^6$	Causa la gripe bacteriana
Synechocystis sp.	$3{,}9 \times 10^6$	Cianobacteria
Bacillus subtilis	$4{,}2 \times 10^6$	Bacteria comúnmente presente en el suelo
Escherichia coli	$4{,}6 \times 10^6$	Algunas cepas son patógenas en humanos
Saccharomyces cerevisiae	$1{,}2 \times 10^7$	Eucariota unicelular
Caenorhabditis elegans	$1{,}0 \times 10^8$	Gusano
Arabidopsis thaliana	$1{,}2 \times 10^8$	Planta vascular
Drosophila melanogaster	$1{,}8 \times 10^8$	Mosca ("mosca del vinagre")
Mus musculus	$2{,}7 \times 10^9$	Ratón
Homo sapiens	$3{,}0 \times 10^9$	Ser humano
Paris japonica	$1{,}5 \times 10^{11}$	*Paris japonica*

Fuente: www.ncbi.nih.gov/genome; J. Pellicer et al., *Bot. J. Linn. Soc.* 164:10, 2010.

recido por duplicación génica seguida de cambios graduales en las secuencias de cada una de las dos copias. Generalmente, las proteínas parálogas son similares no únicamente en secuencia sino también en estructura tridimensional, aunque es habitual que hayan adquirido funciones diferentes a lo largo de su evolución.

Dos genes (o proteínas) homólogos de especies *diferentes* se denominan ortólogos y sus productos génicos son **ortólogos**. Es frecuente observar que los ortólogos tienen la misma función en ambos organismos, por lo que cuando se encuentra que un gen recién secuenciado de una especie es altamente ortólogo con un gen de otra especie se presume que el gen codifica una proteína con la misma función en las dos especies. De este modo resulta posible deducir la función de los productos génicos (proteínas o moléculas de RNA) a partir de la secuencia genómica, sin necesidad de caracterización bioquímica alguna de la proteína codificada. Un **genoma anotado** contiene, además de la secuencia del DNA, una descripción de la función probable de cada producto génico deducida a partir de las comparaciones con otras secuencias genómicas con funciones proteicas establecidas. En ocasiones, la identificación de las rutas (conjuntos de enzimas) codificadas en un genoma, permite deducir a partir de la secuencia genómica las capacidades metabólicas de un organismo.

Las diferencias secuenciales entre genes homólogos pueden utilizarse como una primera aproximación para medir el grado de divergencia evolutiva entre dos especies, es decir, el tiempo transcurrido desde que su precursor evolutivo común dio lugar a dos líneas con diferente camino evolutivo. A mayor número de diferencias secuenciales, mayor será el tiempo transcurrido desde la divergencia en su historia evolutiva. Es posible construir una filogenia (o árbol evolutivo) donde la distancia evolutiva entre dos especies cualquiera se represente por su proximidad en el árbol correspondiente (se muestra un ejemplo en la Fig. 1-5).

A lo largo de la evolución van apareciendo nuevas estructuras, procesos o mecanismos reguladores que reflejan los cambios en los genomas de los organismos en evolución. El genoma de un eucariota sencillo tal como la levadura debería poseer genes relacionados con la formación de la membrana nuclear, no presentes en bacterias o arqueas. El genoma de un insecto contendrá genes que codifiquen proteínas involucradas en la especificación de los segmentos corporales característicos de los insectos, unos genes que no se esperan en el genoma de la levadura. El genoma de todos los vertebrados debe contener genes que especifiquen el desarrollo de la columna vertebral, y los mamíferos deben poseer en exclusiva aquellos genes necesarios para el desarrollo de la placenta, una característica de los mamíferos. Y así sucesivamente. La comparación de genomas completos de diferentes especies de cada phylum está permitiendo la identificación de genes críticos para los cambios evolutivos fundamentales en el plan corporal y el desarrollo.

La genómica funcional permite asignar genes a procesos celulares específicos

Cuando la tarea de la secuenciación del genoma y de la asignación de funciones a cada uno de los genes ha concluido, los investigadores en genética molecular pueden agrupar genes de acuerdo con los procesos en los que intervienen (síntesis del DNA, síntesis proteica, generación de ATP, etc.) y deducir qué fracción del genoma está asignada a cada una de las actividades celulares. El conjunto más numeroso de genes de *E. coli*, *A. thaliana*, y *H. sapiens* es el de los genes de función (todavía) desconocida y representa más del 40% en cada una de esas especies. Los transportadores de iones y pequeñas moléculas a través de las membranas plasmáticas suponen una importante proporción de genes en las tres especies, mayor en la bacteria y la planta que en el mamífero (el 10% de los ~4.400 genes de *E. coli*, ~8% de los ~27.000 genes de *A. thaliana* y ~4% de los ~20.000 genes de *H. sapiens*). Los genes que codifican las proteínas y el RNA necesarios para la síntesis proteica representan entre el 3% y el 4% del genoma de *E. coli*, pero en las células más complejas de *A. thaliana* son necesarios más genes para dirigir las proteínas a su localización celular final que para la propia síntesis proteica (aproximadamente el 6% y el 2% del genoma, respectivamente). En general, cuanto más complejo es el organismo, mayor es la proporción de su genoma que codifica genes implicados en la *regulación* de procesos celulares y menor la proporción de los dedicados a los procesos básicos, o de "mantenimiento" tales como la generación de ATP y la síntesis de proteínas. Los **genes constitutivos** dedicados a estas funciones de mantenimiento, se expresan normalmente en cualquier condición y no están sujetos a mucha regulación.

Las comparaciones genómicas tienen una importancia cada vez mayor en la biología y medicina humanas



Los genomas del chimpancé y del ser humano son idénticos en un 99,9% y, a pesar de ello, las diferencias entre las dos especies son muchas. Las relativamente pocas diferencias en dotación genética deben explicar la posesión del lenguaje por parte de los humanos, las extraordinarias cualidades atléticas de los chimpancés y muchísimas diferencias más. Las comparaciones genómicas hacen posible que los investigadores identifiquen genes asociados a las divergencias entre los programas de desarrollo de los seres humanos y de otros primates y con la aparición de funciones complejas tales como el lenguaje. La imagen resultante será tanto más nítida cuanto mayor sea el número de genomas de primates secuenciados y disponibles para su comparación con el genoma humano.

De manera parecida, las diferencias en la dotación genética entre humanos son ínfimas en comparación con las diferencias entre humanos y chimpancés, aunque estas diferencias explican la variedad entre individuos –como por ejemplo, diferencias en la salud y en la susceptibilidad a las enfermedades crónicas. Todavía debemos aprender mucho acerca de la variabilidad secuencial entre humanos, y es prácticamente seguro que la disponibilidad de información genómica transformará los conceptos del diagnóstico y el tratamiento médicos. Varios estudios masivos, llevados a cabo con el objeto de secuenciar genomas enteros de centenares de miles de personas con cáncer, diabetes de tipo 2, esquizofrenia y otras enfermedades, han permitido la identificación de muchos genes en los que se correlacionan las mutaciones observadas con la enfermedad. Cada

uno de estos genes codifica una proteína susceptible, en principio, de convertirse en una diana terapéutica. Podemos esperar que los tratamientos paliativos den paso a remedios curativos en los casos de algunas enfermedades genéticas y que se propongan medidas preventivas cada vez más efectivas relacionadas con la susceptibilidad a enfermedades asociada con ciertos marcadores genéticos concretos. La "historia clínica" de hoy podría ser pronto reemplazada por un "pronóstico clínico". ■

RESUMEN 1.5 Fundamentos evolutivos

■ Ciertas mutaciones ocasionales en la herencia genética dan lugar a organismos mejor adaptados a la supervivencia y reproducción en un nicho ecológico determinado y a que su progenie domine la población de ese nicho. Este proceso de mutación y selección es la base de la evolución Darwiniana que ha resultado en los organismos modernos a partir de una primera célula. El gran número de genes compartidos por todos los organismos vivos explica la similitud fundamental entre todos ellos.

■ La vida apareció hace aproximadamente 3.500 millones de años, probablemente gracias a la formación de un compartimiento rodeado de membrana que contenía moléculas de RNA capaces de autorreplicarse. Los componentes de la primera célula surgieron probablemente cerca de respiraderos hidrotermales del fondo marino o como producto de la acción de las descargas eléctricas y las elevadas temperaturas sobre moléculas atmosféricas simples tales como CO_2 y NH_3.

■ Las proteínas y el DNA, respectivamente, fueron reemplazando a lo largo del tiempo las funciones catalítica y genética del genoma de RNA primigenio

■ Las células eucarióticas adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa a partir de bacterias endosimbióticas. En los organismos multicelulares, líneas celulares diferenciadas se especializan en una o más funciones esenciales para la supervivencia del organismo.

■ El conocimiento de las secuencias nucleotídicas genómicas completas de organismos de diferentes ramas del árbol filogenético proporciona datos sobre la evolución y ofrece enormes oportunidades a la medicina humana.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

metabolito 3
núcleo 3
genoma 3
Eucariotas 3
bacteria 5
arquea 5
citoesqueleto 7
estereoisómeros 16
configuración 16
centro quiral 16
conformación 19
entropía, *S* 22
entalpía, *H* 23
variación de energía libre, ΔG 23
reacción endergónica 23
reacción exergónica 23
equilibrio 25
variación de energía libre estándar, $\Delta G°$ 26
energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$ 28
catabolismo 28
anabolismo 29
metabolismo 29
biología de sistemas 29
mutación 32
genes constitutivos 39

Problemas

A continuación se proponen algunos problemas relacionados con el contenido del capítulo. (Para resolver los problemas del final del capítulo resulta de utilidad referirse a las tablas que se encuentran en la contracubierta posterior). Cada problema recibe un título para facilitar su referencia y discusión. Recuerde que en los problemas numéricos las respuestas deben expresarse con el número adecuado de cifras significativas. En el Apéndice B se encuentran las soluciones abreviadas; las soluciones completas se publican en la *Absolute Ultimate Study Guide to Accompany Principles of Biochemistry*.

1. El tamaño de las células y sus componentes

(a) Si se pudiera hacer crecer una célula 10.000 veces (que es el típico aumento que se consigue con un microscopio electrónico), ¿qué tamaño tendría? Suponga que está observando una célula eucariótica "típica" con un diámetro celular de 50 μm.

(b) Si esta célula fuera una célula muscular (miocito), ¿cuántas moléculas de actina podría albergar? Suponga que la célula muscular es esférica y que no hay otros componentes presentes; las moléculas de actina son esféricas con un diámetro de 3,6 nm. (El volumen de una esfera es de $4/3\pi r^3$).

(c) Si la célula fuera una célula hepática (hepatocito) de las mismas dimensiones, ¿cuántas mitocondrias podría contener? Suponga que la célula es esférica, que no hay otros componentes presentes y que la mitocondria es esférica con un diámetro de 1,5 µm.

(d) La glucosa es el principal nutriente energético para la mayoría de las células. Suponiendo que está presente en concentraciones de 1 mM (es decir, 1 milimol/L), calcule cuántas moléculas de glucosa estarían presentes en la hipotética (y esférica) célula eucariótica. (El número de Avogadro, el número de moléculas en un mol de una sustancia no ionizada es de $6{,}02 \times 10^{23}$).

(e) La hexoquinasa es un enzima importante en el metabolismo de la glucosa. Si la concentración de hexoquinasa en nuestra célula eucariota es de 20µM ¿cuántas moléculas de glucosa estarán disponibles para ser metabolizadas por cada molécula de hexoquinasa?

2. Componentes de *E.coli* Las células de *E. coli* tienen forma de varilla, con aproximadamente 2 µm de longitud y 0,8 µm de diámetro. El volumen de un cilindro es de $\pi r^2 h$, donde h es la altura del cilindro.

(a) Si la densidad media de *E. coli* (principalmente formada por agua) es de $1{,}1 \times 10^3$ g/L, ¿Cuál es la masa de una sola célula?

(b) La cubierta protectora de *E. coli* tiene un grosor de 10 nm. ¿Cuál es el porcentaje del volumen total de la bacteria ocupado por la cubierta?

(c) *E. coli* es capaz de crecer y multiplicarse rápidamente gracias a la presencia de unos 15.000 ribosomas esféricos (diámetro 18 nm) en cada célula, que llevan a cabo la síntesis de proteínas. ¿Cuál es el porcentaje del volumen celular total ocupado por los ribosomas?

3. Información genética en el DNA de *E. coli* La información genética contenida en el DNA consiste en una secuencia lineal de unidades de codificación, denominadas codones. Cada codón es una secuencia específica de tres desoxirribonucleótidos (tres pares de desoxirribonucleótidos en el DNA

de doble cadena), y cada codón codifica un único aminoácido en una proteína. La masa molecular de una molécula de DNA de *E. coli* es de aproximadamente $3{,}1 \times 10^9$ g/mol. La masa molecular media de un par de nucleótidos es de 660 g/mol, y cada nucleótido contribuye con 0,34 nm a la longitud del DNA.

(a) Calcule la longitud de una molécula de DNA de *E. coli*. Compare la longitud de la molécula de DNA con las dimensiones reales de la célula (véase Problema 2). ¿Cómo puede caber la molécula de DNA en el interior de la célula?

(b) Considere que la proteína promedio de *E. coli* tiene una cadena de 400 aminoácidos. ¿Cuál es el número máximo de proteínas que pueden ser codificadas por una molécula de DNA de *E. coli*?

4. El elevado régimen del metabolismo bacteriano Las células bacterianas tienen un metabolismo mucho más rápido que las células animales. En condiciones ideales, algunas bacterias multiplican su tamaño por dos y se dividen en 20 min, mientras que la mayoría de células animales requieren 24 h en condiciones de crecimiento rápido. El elevado régimen del metabolismo bacteriano exige que la relación entre la superficie celular y su volumen sea grande.

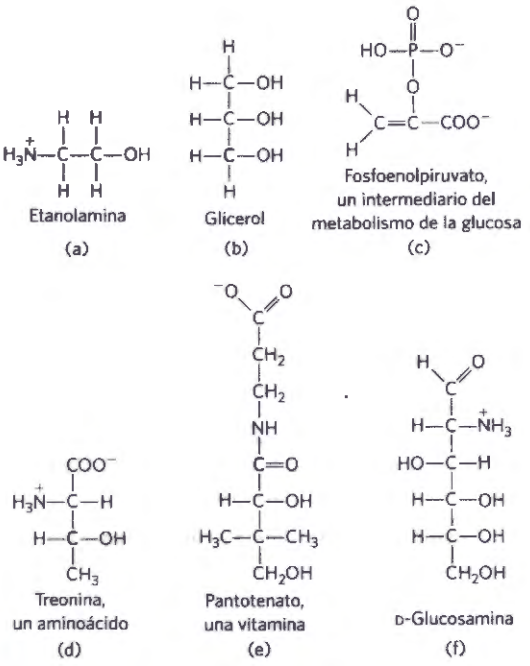
(a) ¿Cuál es la razón de que la relación superficie-volumen tenga efecto sobre la velocidad del metabolismo?

(b) Calcule la relación superficie-volumen para la bacteria esférica *Neisseria gonorrhoeae* (diámetro 0,5 μm), responsable de la enfermedad denominada gonorrea. Compárela con la relación superficie-volumen de una ameba globular, una célula eucariótica de gran tamaño (150 μm de diámetro). El área de una esfera es $4\pi r^2$.

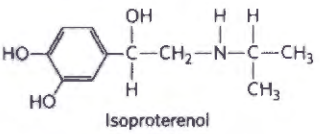
5. Transporte axonal rápido Las neuronas poseen extensiones largas y finas denominadas axones, estructuras especializadas que conducen señales a través del sistema nervioso del organismo. Algunas extensiones axonales pueden tener hasta 2 m; por ejemplo, los axones que se originan en la médula espinal y terminan en los músculos de los dedos de los pies. Pequeñas vesículas recubiertas de membrana que transportan materiales esenciales para la función axonal se desplazan a lo largo de microtúbulos del citoesqueleto, desde el cuerpo de la célula hasta la punta de los axones. Si la velocidad media de una vesícula es de 1 μm/s, ¿cuánto tiempo tarda una vesícula en moverse desde el cuerpo celular en la médula espinal hasta la punta del axón en los dedos de los pies?

6. La vitamina C sintética, ¿es tan buena como la natural? Los productores de alimentos "sanos" insisten en que las vitaminas obtenidas de fuentes naturales son más saludables que las obtenidas por métodos sintéticos. Se dice, por ejemplo, que el ácido L-ascórbico puro (vitamina C) obtenido del escaramujo es mejor que el ácido L-ascórbico puro obtenido en una planta química. ¿Son diferentes las dos vitaminas? ¿Puede el organismo distinguir la fuente de una vitamina?

7. Identificación de grupos funcionales En las figuras 1-16 y 1-17 se muestran algunos de los grupos funcionales más comunes de las biomoléculas. Es importante saberlos identificar, puesto que las actividades y las propiedades biológicas de las biomoléculas están determinadas en gran parte por sus grupos funcionales. Identifique y nombre cada uno de los grupos funcionales que forman parte de los siguientes compuestos.



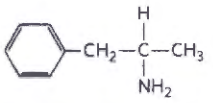
8. Actividad de fármacos y estereoquímica En ocasiones, las diferencias cuantitativas en la actividad biológica de dos enantiómeros de un compuesto son bastante grandes. Por ejemplo, el isómero D del fármaco isoprotenerol, utilizado en el tratamiento del asma leve, es entre 50 y 80 veces más efectivo como broncodilatador que el isómero L. Identifique el centro quiral del isoprotenerol. ¿Cuál puede ser la causa de que dos enantiómeros posean actividades biológicas tan radicalmente diferentes?



9. Separación de biomoléculas Al estudiar una biomolécula particular (una proteína, ácido nucleico, glúcido o lípido) en el laboratorio, el bioquímico necesita en primer lugar separarla del resto de biomoléculas de la muestra –es decir, *purificarla*. En capítulos posteriores se considerarán las técnicas específicas de purificación. Sin embargo, considerando simplemente las unidades monoméricas que constituyen las biomoléculas, deberíamos tener algunas ideas sobre qué características de la molécula nos permitirían separarla de las otras moléculas. Por ejemplo, ¿cómo se podrían separar (a) aminoácidos de ácidos grasos y (b) nucleótidos de glucosa?

10. ¿Una vida basada en el silicio? El silicio pertenece al mismo grupo de la tabla periódica que el carbono y, como éste, puede formar hasta cuatro enlaces simples. Muchas historias de ciencia ficción se han basado en la premisa de una vida basada en el silicio. ¿Sería esto posible? ¿Qué características del silicio lo hacen *menos* apto que el carbono para actuar como el elemento central organizador de la vida? Para responder a esta pregunta considere lo aprendido acerca de la versatilidad del enlace del carbono, además de consultar un libro de texto básico de química inorgánica para averiguar las propiedades de enlace del silicio.

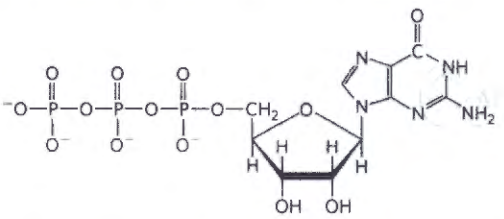
11. Acción farmacológica y estructura molecular Hace algunos años dos compañías farmacéuticas comercializaron un fármaco bajo los nombres comerciales de Dexedrina y Benzedrina. La estructura del compuesto es la siguiente:



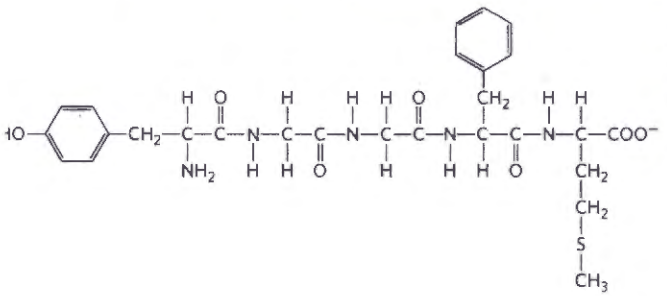
Las propiedades físicas (análisis elemental de C, H y N, punto de fusión, solubilidad, etc.) de la Dexedrina y de la Benzedrina eran idénticas. La dosis oral recomendada de Dexedrina (que todavía se encuentra a la venta) era de 5 mg/día, pero la dosis recomendada de Benzedrina (retirada del mercado) era el doble. Aparentemente hacía falta mucha más Benzedrina que Dexedrina para conseguir la misma respuesta fisiológica. Explique esta contradicción aparente.

12. Componentes de biomoléculas complejas En la figura 1-10 se muestran los principales componentes de biomoléculas complejas. Identifique los constituyentes de cada una de las tres importantes biomoléculas que se muestran a continuación (presentadas en sus formas ionizadas a pH fisiológico).

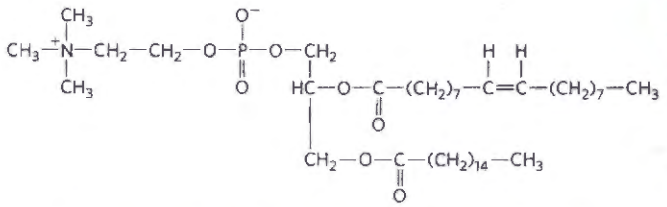
(a) Guanosina trifosfato (GTP), un nucleótido rico en energía que sirve de precursor del RNA:



(b) Metionina-encefalina, el opiáceo endógeno del cerebro:



(c) Fosfatidilcolina., un componente habitual de las membranas:



13. Determinación de la estructura de una biomolécula Se aisló una sustancia desconocida, X, a partir del músculo de conejo. La estructura de X se determinó a partir de los siguientes experimentos y observaciones. El análisis cuantitativo demostró que X se componía exclusivamente de C, H y O. Se oxidó completamente una muestra de X de peso conocido y se midieron las cantidades de H_2O y CO_2 producidas. A partir de este análisis cuantitativo, se llegó a la conclusión de que X contenía un 40,00% de C, un 6,71% de H y un 53,29% de O en peso. Se determinó la masa molecular de X por espectrometría de masas, y resultó ser de 90,00 u (unidades de masa atómica; véase Recuadro 1-1). La espectroscopia de infrarrojo demostró que X contenía un enlace doble. X se disolvía fácilmente en agua dando una disolución ácida; la disolución mostró actividad óptica al ser analizada con un polarímetro.

(a) Determine las fórmulas empírica y molecular de X.

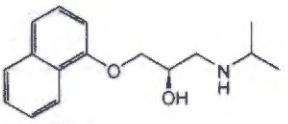
(b) Dibuje las posibles estructuras de X que sean congruentes con la fórmula molecular y contengan un doble enlace. Considere *solamente* estructuras lineales o ramificadas y no estructuras cíclicas. Recuerde que los enlaces del oxígeno consigo mismo son poco estables.

(c) ¿Cuál es el significado estructural de la actividad óptica observada? ¿Qué estructuras de (b) son consistentes con esta observación?

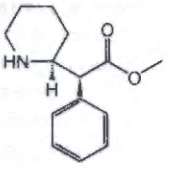
(d) ¿Cuál es el significado estructural de la observación acerca del carácter acídico de una disolución de X? ¿Qué estructuras de (b) son consistentes con esta observación?

(e) ¿Cuál es la estructura de X? ¿Existe más de una estructura consistente con todos los datos aportados?

14. Dando nombres a estereoisómeros con un carbono quiral usando el sistema RS El propranolol es una compuesto quiral. El (*R*)-propranolol es usado como anticonceptivo; el (*S*)-propranolol se usa para tratar la hipertensión. Identifique el carbono quiral de la estructura representada. ¿Se trata del isómero (*R*) o del isómero (*S*)? Dibuje el otro isómero.



15. Dando nombres a estereoisómeros con dos carbonos quirales usando el sistema RS El isómero (*R*, *R*) del metilfenidato (Ritalin) se usa para tratar el trastorno de hiperactividad por déficit de atención (TDAH). El isómero (*S*, *S*) es un antidepresivo. Identifique los dos carbonos quirales de la estructura representada. ¿Se trata del isómero (*R*, *R*) o del isómero (*S*, *S*)? Dibuje el otro isómero.



Problema de análisis de datos

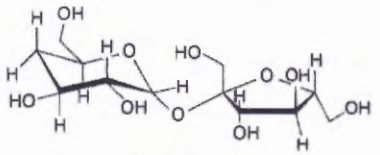
16. Interacción de compuestos de sabor dulce con receptores del gusto Muchos compuestos tienen sabor dulce. El sabor dulce se percibe cuando una molécula se une a un receptor dulce, un tipo de receptor gustativo, en la superficie de ciertas células linguales. Cuanto más fuerte sea la unión, menor será la concentración necesaria para saturar el receptor y más dulce será el sabor percibido a partir de una concentración determinada de esa sustancia. La variación de la energía libre

estándar, ΔG°, de la reacción de unión de la molécula dulce a su receptor se puede medir en kilojoules o kilocalorías por mol.

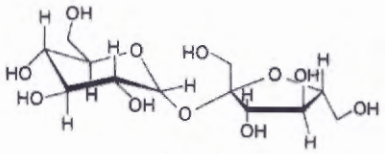
El sabor dulce se puede cuantificar en unidades de "dulzor molar relativo" (MRS, según sus siglas en inglés), que compara el dulzor de una sustancia con respecto al de la sacarosa. La sacarina, por ejemplo, tiene una MRS de 161, lo que significa que la sacarina es 161 veces más dulce que la sacarosa. En términos prácticos, esto se mide en base a la percepción del grado de dulzor que tienen personas voluntarias cuando prueban disoluciones de cada compuesto a diversas concentraciones. La sacarosa y la sacarina saben igualmente dulces cuando la primera está a una concentración 161 veces mayor que la segunda.

(a) ¿Cuál es la relación entre MRS y la ΔG° de la reacción de unión? De modo más concreto, ¿Correspondería una ΔG° más negativa a un valor mayor o menor de MRS? Explique su razonamiento.

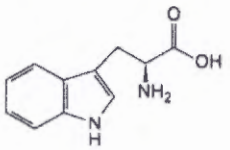
Se muestran a continuación las estructuras de 10 compuestos que tienen sabor dulce para el ser humano. En cada caso se expresan los valores de MRS y de ΔG° de unión al receptor dulce respectivo.



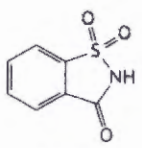
Desoxisacarosa
MRS = 0,95
ΔG° = −6,67 kcal/mol



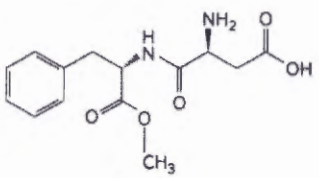
Sacarosa
MRS = 1
ΔG° = −6,71 kcal/mol



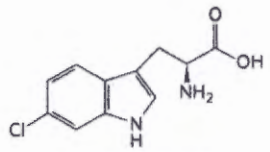
D-Triptófano
MRS = 21
ΔG° = −8,5 kcal/mol



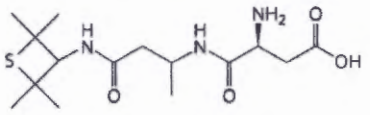
Sacarina
MRS = 161
ΔG° = −9,7 kcal/mol



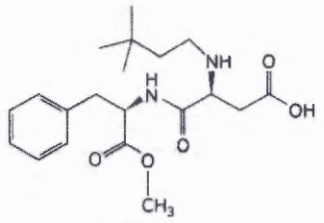
Aspartame
MRS = 172
ΔG° = −9,7 kcal/mol



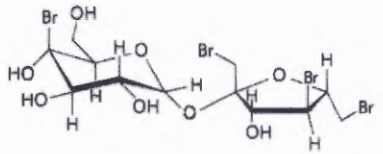
6-Cloro- D-triptófano
MRS = 906
ΔG° = −10,7 kcal/mol



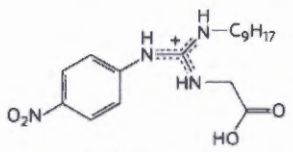
Alitame
MRS = 1.937
ΔG° = −11,1 kcal/



Neotame
MRS = 11.057
ΔG° = −12,1 kcal/mol



Tetrabromosacarosa
MRS = 13.012
ΔG° = −12,2 kcal/mol



Ácido sucrónico
MRS = 200.000
ΔG° = −13,8 kcal/mol

Morini, Bassoli y Temussi (2005) usaron métodos computacionales (descritos a menudo como métodos "in silico") para modelar la unión de moléculas dulces al receptor dulce.

(b) ¿Por qué son útiles los modelos de ordenador para predecir el dulzor de las moléculas en lugar de los ensayos de sabor en humanos o en animales?

En un trabajo previo, Schallenberger y Acree (1967) habían sugerido que todas las moléculas dulces poseían un grupo estructural "AH-B" en el que "A y B son átomos electronegativos separados por una distancia superior a 2,5 Å [0,25 nm] pero menor que 4 Å [0,4 nm]. H es un átomo de hidrógeno unido a uno de los átomos electronegativos por un enlace covalente".

(c) Dado que la longitud de un enlace simple "típico" es de aproximadamente 0,15 nm, identifique el o los grupos AH-B en cada una de las moléculas anteriores.

(d) En base a sus conclusiones en el ejercicio (c), enuncie dos objeciones a la frase "las moléculas que contienen un grupo AH-B tienen sabor dulce."

(e) El modelo AH-B se *puede* usar con dos de las moléculas mostradas para explicar las diferencias de MRS y $\Delta G°$. ¿Cuáles son esas dos moléculas y cómo las emplearía para justificar el modelo AH-B?

(f) Varias de las moléculas tienen estructuras muy parecidas pero valores muy diferentes de MRS y $\Delta G°$. Dé dos ejemplos y utilícelos para demostrar que el modelo AH-B no es capaz de explicar las diferencias observadas en dulzor.

En su modelado por computador, Morini y colaboradores usaron la estructura tridimensional del receptor dulce y un programa de dinámica molecular llamado GRAMM para predecir la $\Delta G°$ de la unión de las moléculas al receptor. En primer lugar "entrenaron" su modelo, es decir, refinaron los parámetros con el fin de que los valores de $\Delta G°$ predichos por el modelo coincidieran con los valores conocidos de $\Delta G°$ para un grupo de moléculas (el "grupo de entrenamiento"). A continuación "ensayaron" el modelo haciendo que predijera los valores de $\Delta G°$ para un nuevo grupo de moléculas (el "grupo prueba").

(g) ¿Por qué necesitaron Morini y colaboradores ensayar su modelo frente a un grupo de moléculas diferente del grupo con el que fue entrenado?

(h) Los investigadores hallaron que los valores predichos de $\Delta G°$ para el grupo de prueba diferían de los valores reales una media de 1,3 kcal/mol. Usando los valores dados con las estructuras anteriores, estime el error resultante en los valores de MRS.

Referencias

Morini, G., A. Bassoli, and P.A. Temussi. 2005. From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* 48:5520–5529.

Schallenberger, R.S., and T.E. Acree. 1967. Molecular theory of sweet taste. *Nature* 216:480–482.

Bibliografía complementaria se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

PARTE I

ESTRUCTURA Y CATÁLISIS

2 El agua 47

3 Aminoácidos, péptidos y proteínas 75

4 Estructura tridimensional de las proteínas 115

5 Función de las proteínas 157

6 Enzimas 189

7 Glúcidos y glucobiología 243

8 Nucleótidos y ácidos nucleicos 281

9 Tecnologías de la información basadas en el DNA 319

10 Lípidos 359

11 Membranas biológicas y transporte 387

12 Bioseñalización 437

La bioquímica no es otra cosa que la química de la vida: sí, es posible investigar, analizar y comprender la vida. Para empezar, todo estudiante de bioquímica necesita un lenguaje y algunos fundamentos básicos; son los que se ven en la Parte I.

Los capítulos de la Parte I se dedican a la estructura y función de las principales clases de componentes celulares: el agua (Capítulo 2), los aminoácidos y las proteínas (Capítulos 3 a 6), los azúcares y los polisacáridos (Capítulo 7), los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8), los ácidos grasos y los lípidos (Capítulo 10) y, finalmente, las membranas y las proteínas señalizadoras de membrana (Capítulos 11 y 12). También trataremos, en el contexto de estructura y función, las tecnologías empleadas para estudiar cada clase de biomoléculas. Se dedica un capítulo entero (Capítulo 9) a las biotecnologías asociadas con el clonaje y la genómica.

El Capítulo 2 se inicia con el agua porque sus propiedades afectan la estructura y la función de todos los demás constituyentes celulares. Para cada clase de molécula orgánica estudiaremos en primer lugar la estructura covalente de sus unidades monoméricas (aminoácidos, monosacáridos, nucleótidos y ácidos grasos) para pasar luego a describir las estructuras de las macromoléculas y complejos supramoleculares derivados de ellas. Un aspecto constantemente presente es que las macromoléculas poliméricas de los sistemas vivos, aunque de gran tamaño, son entidades químicas muy ordenadas con secuencias específicas de las subunidades monoméricas, lo que da lugar a estructuras y funciones discretas. Este aspecto fundamental se puede descomponer en tres principios interrelacionados: (1) la estructura única de cada macromolécula determina su función; (2) las interacciones no covalentes tienen un papel crítico en la estructura y, por tanto, en la función de las macromoléculas; y (3) las subunidades monoméricas en las macromoléculas poliméricas están dispuestas según secuencias específicas, lo que representa una forma de información de la que depende el estado vivo ordenado.

La relación entre estructura y función es especialmente evidente en las proteínas, que muestran una extraordinaria diversidad de funciones. Una secuencia polimérica de aminoácidos produce una estructura fibrosa resistente como la que se encuentra en el cabello y en la lana; otra secuencia da lugar a una proteína que transporta oxígeno en la sangre; una tercera se une a otras proteínas y cataliza la rotura de los enlaces entre sus aminoácidos. De modo parecido se pueden entender las funciones especiales de los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos como la consecuencia directa de su estructura química, con sus subunidades monoméricas características unidas de manera precisa para formar polímeros funcionales. Los azúcares enlazados entre sí se transforman en almacenes de energía, en fibras estructurales y en puntos de reconocimiento molecular específico; los nucleótidos encadenados en el DNA o

RNA contienen las instrucciones para la construcción de un organismo completo; y los lípidos agregados forman las membranas. En el Capítulo 12 se unifica la discusión sobre las funciones de las biomoléculas, describiendo la manera en que los sistemas de señalización específicos regulan las actividades de las biomoléculas dentro de una célula, dentro de un órgano y entre órganos, para mantener un organismo en homeostasis.

A medida que pasamos de unidades monoméricas a polímeros cada vez mayores, el énfasis en los aspectos químicos se desplaza desde los enlaces covalentes a las interacciones no covalentes. Los enlaces covalentes, tanto a nivel monomérico como macromolecular, imponen restricciones sobre la forma adoptada por las biomoléculas grandes. Sin embargo, las numerosas interacciones no covalentes determinan la conformación nativa estable de las moléculas grandes a la vez que permiten la flexibilidad necesaria para su función biológica. Como se expone más adelante, las interacciones no covalentes son esenciales para que los enzimas manifiesten su poder catalítico, para la interacción específica de los pares de bases complementarias en los ácidos nucleicos, y el ordenamiento y propiedades de los lípidos en las membranas. El principio de que las secuencias de unidades monoméricas son ricas en información aparece de manera clara en la discusión de los ácidos nucleicos (Capítulo 8). No obstante, las proteínas y algunos polímeros cortos de azúcares (oligosacáridos) también son moléculas ricas en información. La secuencia de aminoácidos es una forma de información que dirige el plegamiento de la proteína hacia su estructura tridimensional única y, en último término, determina la función de la misma. Algunos oligosacáridos también tienen secuencias y estructuras tridimensionales únicas que pueden ser reconocidas por otras macromoléculas.

Cada clase de moléculas tiene una jerarquía estructural similar: subunidades de estructura determinada se conectan mediante enlaces de flexibilidad limitada formando macromoléculas de estructura tridimensional determinada por interacciones no covalentes. Estas macromoléculas interaccionan a su vez para formar las estructuras supramoleculares y los orgánulos que permiten a una célula llevar a cabo sus numerosas funciones metabólicas. En su conjunto las moléculas descritas en la Parte I son el material del que está hecha la vida.

CAPÍTULO 2

El Agua

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

2.1 **Interacciones débiles en los sistemas acuosos** 47

2.2 **Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles** 58

2.3 **Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos** 63

2.4 **El agua como reactivo** 69

2.5 **La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos** 69

El agua es la sustancia más abundante en los sistemas vivos y constituye el 70% o más del peso de la mayoría de organismos. Sin duda los primeros organismos vivos aparecieron en un entorno acuoso, y el curso de la evolución ha sido moldeado por las propiedades del medio acuoso en que se inició la vida.

Este capítulo se inicia con la descripción de las propiedades físicas y químicas del agua, a las que se adaptan todas las características de la estructura y función celulares. Las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua y la débil tendencia del agua a ionizarse tienen una importancia crucial para la estructura y función de las biomoléculas. Trataremos el tema de la ionización en términos de constantes de equilibrio, pH y curvas de titulación y consideraremos la forma en la que las disoluciones acuosas de ácidos o bases débiles y de sus sales actúan como tampones contra los cambios de pH en los sistemas biológicos. La molécula de agua y sus productos de ionización, H^+ y OH^-, influyen de manera profunda sobre la estructura, autoensamblaje y propiedades de los componentes celulares, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las interacciones no covalentes responsables de la fuerza y de la especificidad de "reconocimiento" entre las biomoléculas están influidas de manera decisiva por las propiedades disolventes del agua, entre las que se cuenta su capacidad para formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con los solutos.

2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

Los enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua proporcionan las fuerzas de cohesión que hacen que el agua sea líquida a temperatura ambiente y sólida cristalina (hielo), con sus moléculas altamente ordenadas, a temperaturas bajas. Las biomoléculas polares se disuelven fácilmente en el agua porque pueden reemplazar las interacciones agua-agua por interacciones agua-soluto energéticamente más favorables. Por el contrario, las biomoléculas apolares son muy poco solubles en agua porque interfieren en las interacciones agua-agua pero no son capaces de formar interacciones agua-soluto. En disoluciones acuosas, las moléculas apolares tienden a agruparse entre sí. Los enlaces iónicos y de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas (del griego, "temor al agua") y de van der Waals son individualmente débiles, pero colectivamente tienen una influencia muy significativa sobre la estructura tridimensional de las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos de membrana.

Los enlaces de hidrógeno le confieren al agua sus propiedades extraordinarias

El agua tiene un punto de fusión, un punto de ebullición y un calor de vaporización más elevado que la mayoría de disolventes comunes (Tabla 2-1). Estas propiedades extraordinarias del agua son consecuencia de la atracción entre moléculas de agua adyacentes, lo que confiere al agua líquida una gran cohesión interna. Un vistazo a la estructura electrónica de la molécula de H_2O permite deducir la causa de estas atracciones intermoleculares.

Cada átomo de hidrógeno de una molécula de agua comparte un par electrónico con el átomo de oxígeno central. La geometría de la molécula está dictada por las formas de los orbitales electrónicos externos del átomo de oxígeno, que son similares a los orbitales de enlace del carbono sp^3 (véase la Fig. 1-16). Estos orbitales describen aproximadamente un tetraedro, con un átomo de hidrógeno en dos de los vértices y pares de electrones sin compartir en los otros dos **(Fig. 2-1a)**. El ángulo del enlace H—O—H es de 104,5°, ligeramente menos que los 109,5° de un tetraedro perfecto a causa de la

TABLA 2-1 Punto de fusión, punto de ebullición y calor de vaporización de algunos disolventes comunes

	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Calor de vaporización (J/g)[a]
Agua	0	100	2,260
Metanol	–98	65	1,100
Etanol	–117	78	854
Propanol	–127	97	687
Butanol	–90	117	590
Acetona	–95	56	523
Hexano	–98	69	423
Benceno	6	80	394
Butano	–135	–0.5	381
Cloroformo	–63	61	247

[a]Energía calórica necesaria para convertir 1,0 g de un líquido en su punto de ebullición y a presión atmosférica en su estado gaseoso a la misma temperatura. Es una medida directa de la energía requerida para superar las fuerzas de atracción entre moléculas en la fase líquida.

compresión causada por los orbitales no enlazantes del átomo de oxígeno.

El núcleo del oxígeno atrae electrones más fuertemente que el núcleo del hidrógeno (un protón); es decir, el oxígeno es más electronegativo. Esto significa que los electrones compartidos se sitúan con mayor frecuencia cerca del átomo del oxígeno que del de hidrógeno. El resultado de esta forma desigual de compartir los electrones es la formación de dos dipolos eléctricos en la molécula de agua, a lo largo de cada uno de los enlaces H—O; cada hidrógeno es portador de una carga positiva parcial (δ+) y el átomo de oxígeno es portador de una carga negativa parcial igual a la suma de las dos cargas positivas parciales (2 δ–). Como resultado de ello, existe una atracción electrostática entre el átomo de oxígeno de una molécula de agua y el hidrógeno de otra (Fig. 2-1b), que se denomina **enlace de hidrógeno**. A lo largo de este libro, representaremos los enlaces de hidrógeno mediante tres líneas paralelas de color azul, como en la Figura 2-1b.

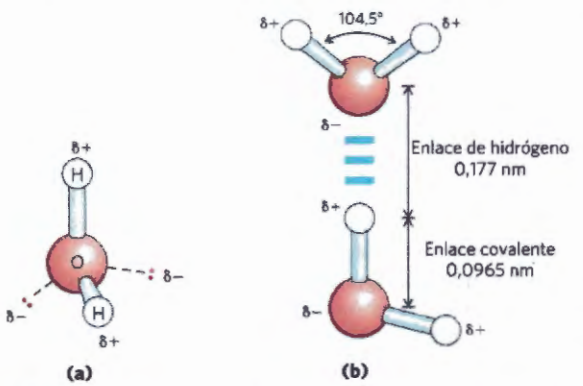


FIGURA 2-1 Estructura de la molécula de agua. La naturaleza dipolar de la molécula de H_2O se muestra en un modelo de bolas y varillas. Las líneas a trazos representan los orbitales no enlazantes. Existe un ordenamiento casi tetraédrico de los pares de electrones de la capa externa alrededor del átomo de oxígeno; los dos átomos de hidrógeno tienen cargas parciales positivas localizadas (δ+) y el átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa (δ–). **(b)** Dos moléculas de H_2O unidas por un enlace de hidrógeno (simbolizado aquí y a lo largo de este libro mediante tres líneas azules) entre el átomo de oxígeno de la molécula superior y un átomo de hidrógeno de la inferior. Los enlaces de hidrógeno son más largos y más débiles que los enlaces O—H covalentes.

Los enlaces de hidrógeno son relativamente débiles. Los que se encuentran en agua líquida tienen una **energía de disociación de enlace** (la energía requerida para romper un enlace) de aproximadamente 23 kJ/mol, en comparación con los 470 kJ/mol del enlace covalente O—H en el agua o los 348 kJ/mol del enlace covalente C—C. El enlace de hidrógeno es aproximadamente 10% covalente, a causa del solapamiento de los orbitales enlazantes, y 90% electrostático. A temperatura ambiente, la energía térmica de una disolución acuosa (la energía cinética del movimiento de los átomos y moléculas individuales) es del mismo orden de magnitud que la necesaria para romper los enlaces de hidrógeno. Cuando se caliente el agua, el incremento de temperatura es un reflejo del movimiento más rápido de las moléculas individuales del agua. En cualquier momento, la mayoría de moléculas en el agua líquida están unidas por enlaces de hidrógeno, pero el tiempo de vida de cada uno de ellos es tan sólo de entre 1 a 20 picosegundos (1 ps = 10-12 s); al romperse un enlace de hidrógeno se forma otro, con la misma molécula o con otra, en el lapso de 0,1 ps. Se usa el término "agrupaciones fluctuantes" ("flickering clusters") para referirse a las agrupaciones de corta duración de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno en fase líquida. La suma de todos los enlaces de hidrógeno entre moléculas de H_2O confiere gran cohesión interna al agua líquida. Las redes de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno forman también puentes de conexión entre solutos (proteínas y ácidos nucleicos, por ejemplo) que permiten que las moléculas de mayor tamaño interaccionen entre ellas a través de distancias de varios nanómetros sin necesidad de entrar en contacto físico.

El ordenamiento casi tetraédrico de los orbitales alrededor del átomo de oxígeno (Fig. 2-1a) permite que cada molécula de agua forme enlaces de hidrógeno con hasta cuatro moléculas de agua vecinas. Sin embargo, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica, las moléculas de agua están desorganizadas y en movimiento continuo, de forma que cada molécula forma enlaces de hidrógeno con un promedio de otras 3,4 moléculas solamente. Por el contra-

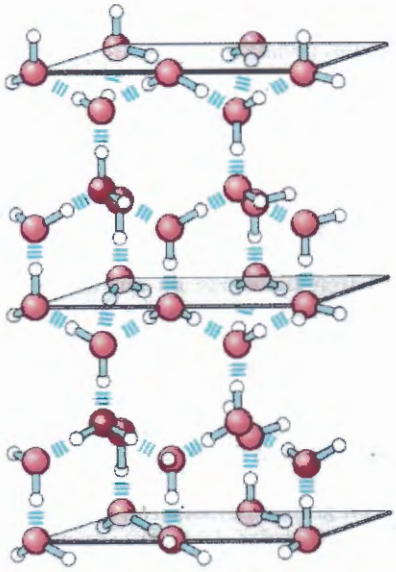


FIGURA 2-2 Enlaces de hidrógeno en el hielo. En el hielo, cada molécula de agua forma cuatro enlaces de hidrógeno, el máximo posible para una molécula de agua, y se crea una red cristalina regular. Por el contrario, en el agua líquida a temperatura ambiente y presión atmosférica cada molécula de agua forma enlaces de hidrógeno con otras 3,4 moléculas de agua en promedio. Esta estructura de red cristalina hace que el hielo sea menos denso que el agua líquida y por eso flota en ella.

rio, en el hielo, cada molécula de agua está fija en el espacio y forma enlaces de hidrógeno con un complemento completo de otras cuatro moléculas de agua formando una estructura reticular regular **(Fig. 2-2)**. Los enlaces de hidrógeno son responsables del relativamente elevado punto de fusión del agua puesto que se requiere mucha energía térmica para romper un número de enlaces de hidrógeno suficiente para desestabilizar la retícula cristalina del hielo (Tabla 2-1). Cuando se funde el hielo o se evapora el agua, se absorbe calor por parte del sistema:

$$H_2O\ (\text{sólido}) \rightarrow H_2O\ (\text{líquido}) \quad \Delta H = +5{,}9\ \text{kJ/mol}$$
$$H_2O\ (\text{líquido}) \rightarrow H_2O\ (\text{gas}) \quad \Delta H = +44{,}0\ \text{kJ/mol}$$

Durante la fusión o la evaporación aumenta la entropía del sistema acuoso a medida que conjuntos altamente ordenados de moléculas de agua en el hielo se relajan para dar paso a los conjuntos de enlaces de hidrógeno menos ordenados del agua líquida o a las moléculas totalmente desordenadas de agua en el estado gaseoso. A temperatura ambiente, tanto la fusión del hielo como la evaporación del agua se dan espontáneamente; la tendencia de las moléculas de agua a asociarse mediante enlaces de hidrógeno es superada por el empuje energético hacia el desorden. Recuerde que el cambio de energía libre (ΔG) ha de tener un valor negativo para que un proceso se produzca de forma espontánea: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde ΔG representa la fuerza impulsora, ΔH el cambio de entalpía relacionado con la rotura y formación de enlaces y ΔS la variación en el grado de desorden. Dado que el valor de ΔH es positivo para la fusión y la evaporación, resulta claro que es el aumento de entropía (ΔS) el que hace que ΔG sea negativa e impulsa estas transformaciones.

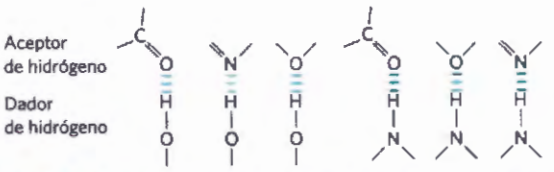


FIGURA 2-3 Tipos comunes de enlaces de hidrógeno en los sistemas biológicos. El aceptor de hidrógeno es usualmente el oxígeno o el nitrógeno; el dador de hidrógeno es otro átomo electronegativo.

El agua forma enlaces de hidrógeno con los solutos polares

Los enlaces de hidrógeno no son exclusivos del agua. Se forman fácilmente entre un átomo electronegativo (el aceptor de hidrógeno, normalmente oxígeno o nitrógeno) y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo (el dador de hidrógeno) en la misma o en otra molécula **(Fig. 2-3)**. Los átomos de hidrógeno unidos covalentemente a átomos de carbono no participan en enlaces de hidrógeno, puesto que el carbono es tan sólo ligeramente más electronegativo que el hidrógeno y, por tanto, el enlace C—H es sólo muy débilmente polar. Esta diferencia explica por qué el butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$) tiene un punto de ebullición de solamente -0,5°C, mientras que el butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$) tiene un punto de ebullición relativamente alto de 117°C. El butanol tiene un grupo hidroxilo polar, por lo que puede formar enlaces de hidrógeno intermoleculares. Las biomoléculas no cargadas pero polares tales como los azúcares se disuelven fácilmente en el agua debido al

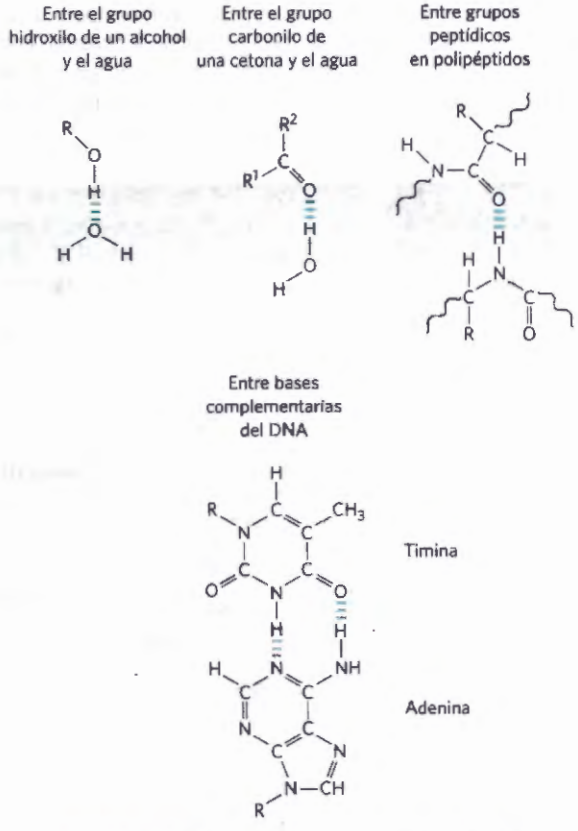


FIGURA 2-4 Algunos enlaces de hidrógeno de importancia biológica.

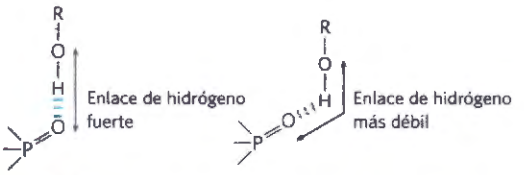


FIGURA 2-5 Direccionalidad del enlace de hidrógeno. La atracción entre las cargas eléctricas parciales (véase la Fig. 2-1) es máxima cuando los tres átomos implicados (en este caso O, H y O) se hallan en línea recta. Cuando los grupos unidos por enlace de hidrógeno sufren restricciones estructurales (como por ejemplo cuando forman parte de una única molécula de proteína), esta geometría ideal puede no ser posible y el enlace de hidrógeno resultante es más débil.

efecto estabilizador de los enlaces de hidrógeno que se forman entre los grupos hidroxilo o el oxígeno carbonílico del azúcar y las moléculas polares de agua. Los alcoholes, aldehídos, cetonas y los compuestos que contienen enlaces N—H forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua **(Fig. 2-4)** y tienden a ser solubles en agua.

Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando las moléculas unidas están orientadas de forma que la interacción electrostática sea máxima, lo que tiene lugar cuando el átomo de hidrógeno y los dos átomos que lo comparten se encuentran en línea recta, esto es, cuando el átomo aceptor está alineado con el enlace covalente entre el átomo dador y el H **(Fig. 2-5)**. Esta disposición sitúa la carga positiva del ion hidrógeno directamente entre las dos cargas parciales negativas. Los enlaces de hidrógeno tienen pues un carácter altamente direccional y son capaces de mantener dos moléculas o grupos unidos por enlace de hidrógeno en una disposición geométrica específica. Veremos más adelante que esta propiedad de los enlaces de hidrógeno confiere estructuras tridimensionales muy precisas a moléculas de proteínas y ácidos nucleicos en las que existen muchos enlaces de hidrógeno intramoleculares.

El agua interacciona electrostáticamente con los solutos cargados

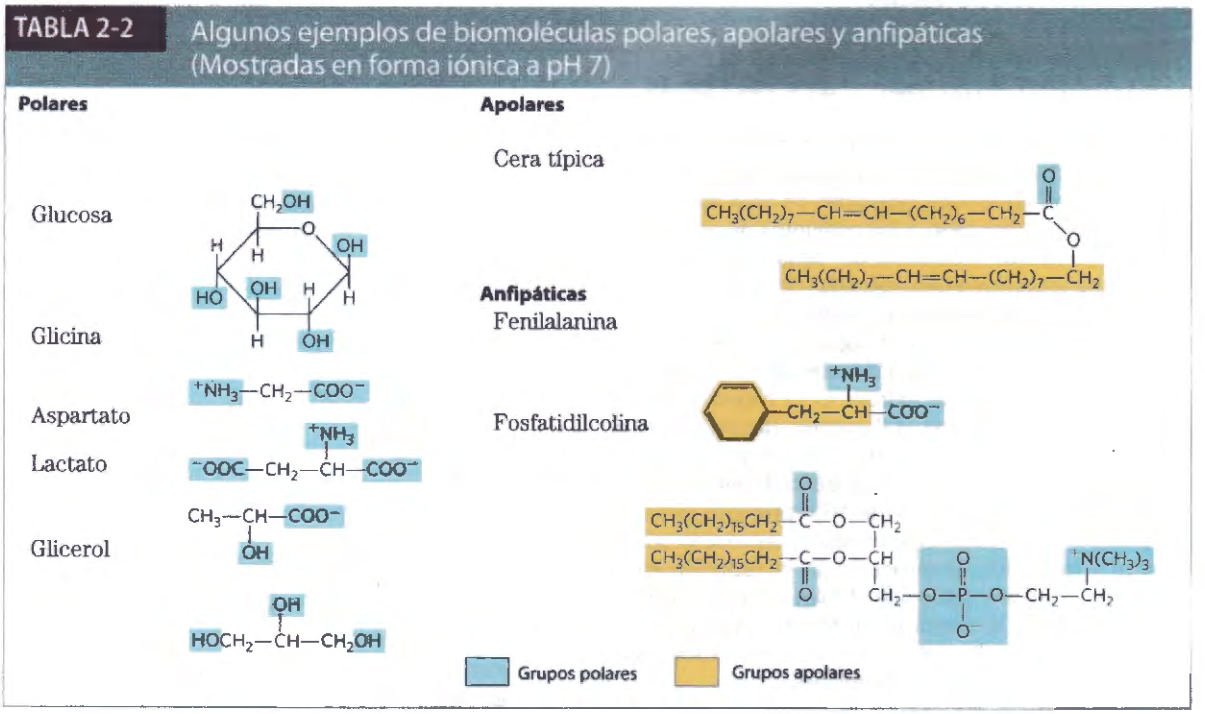
El agua es un disolvente polar. Disuelve fácilmente la mayoría de biomoléculas, que generalmente son compuestos cargados o polares (Tabla 2-2); los compuestos que se disuelven fácilmente en el agua son **hidrofílicos** (del griego, "atraído por el agua"). Por el contrario, los disolventes apolares tales como el cloroformo y el benceno son malos disolventes de las biomoléculas polares, pero disuelven fácilmente las que son **hidrofóbicas**, moléculas apolares tales como los lípidos y las ceras.

El agua disuelve sales, tales como el NaCl, mediante la hidratación y estabilización de los iones Na^+ y Cl^-, debilitando las interacciones electrostáticas entre ellos y contrarrestando así su tendencia a asociarse en una red cristalina **(Fig. 2-6)**. El agua también disuelve fácilmente biomoléculas cargadas, como por ejemplo compuestos con grupos funcionales tales como los ácidos carboxílicos ionizados ($—COO^-$), aminas protonadas ($—NH_3^+$) y ésteres o anhídridos fosfóricos. El agua reemplaza los enlaces de hidrógeno soluto-soluto que mantienen esas biomoléculas unidas por enlaces de hidrógeno soluto-agua, apantallando así las interacciones electrostáticas entre moléculas del soluto.

El agua apantalla de manera efectiva las interacciones electrostáticas entre iones disueltos a causa de su elevada constante dieléctrica, una propiedad física que refleja el número de dipolos en un disolvente. La intensidad o fuerza (F), de las interacciones iónicas en una disolución depende de la magnitud de las cargas (Q), la distancia entre los grupos cargados (r), y la constante dieléctrica (ε, sin dimensiones) del disolvente en el que tienen lugar las interacciones:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\varepsilon r^2}$$

TABLA 2-2 Algunos ejemplos de biomoléculas polares, apolares y anfipáticas (Mostradas en forma iónica a pH 7)



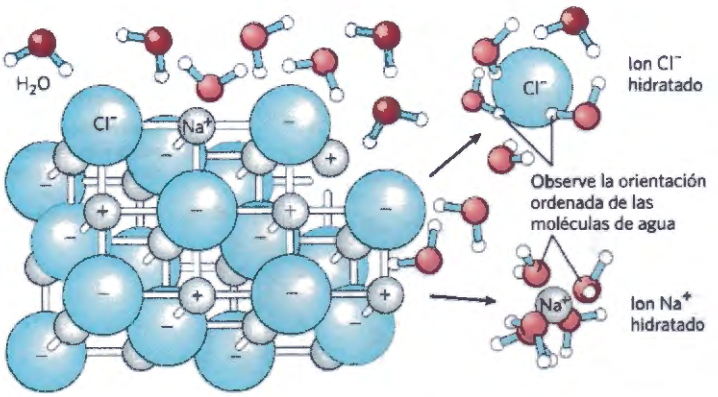


FIGURA 2-6 El agua como disolvente. El agua disuelve muchas sales cristalinas hidratando los iones que las componen. La red cristalina del NaCl se destruye a medida que moléculas de agua se agrupan alrededor de los iones Cl^- y Na^+. Las cargas iónicas están parcialmente neutralizadas y se debilitan las atracciones electrostáticas necesarias para la formación de la red.

Para el agua a 25°C, ε es 78,5 mientras que para el benceno, que es un disolvente muy apolar, ε vale 4,6. Así, las interacciones iónicas entre iones disueltos son mucho más fuertes en los ambientes menos polares. La dependencia respecto a $r2$ hace que las atracciones o repulsiones iónicas operen sólo a distancias muy cortas, del orden de 10 a 40 nm (dependiendo de la concentración de electrolito) cuando el disolvente es el agua.

La entropía aumenta cuando se disuelve una sustancia cristalina

A medida que una sal tal como el NaCl se disuelve, los iones Na^+ y Cl^- que abandonan la red cristalina adquieren una libertad de movimiento mucho mayor (Fig. 2-6). El incremento de entropía (desorden) que se produce en el sistema es el principal responsable de la facilidad con la que se disuelven en agua sales tales como el NaCl. En términos termodinámicos, la disolución tiene lugar con un cambio favorable en la energía libre: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde ΔH tiene un valor positivo pequeño y $T\Delta S$ un valor positivo alto, de forma que ΔG es negativo.

Los gases apolares son poco solubles en agua

Las moléculas de los gases biológicamente importantes tales como el CO_2, O_2 y N_2, son apolares. En el O_2 y N_2 ambos átomos comparten los electrones en la misma proporción. En el CO_2, cada enlace C=O es polar, pero los dos dipolos están dirigidos de manera opuesta, con lo que se anulan entre sí (Tabla 2-3). El movimiento de estas moléculas desde la fase gaseosa desordenada a la fase acuosa restringe su movimiento y el movimiento de las moléculas de agua y representa, por tanto, un descenso de entropía. La naturaleza apolar de estos gases y la disminución de entropía cuando se introducen en la disolución hacen que sean muy poco solubles en agua (Tabla 2-3). Algunos organismos contienen "proteínas transportadoras" hidrosolubles (hemoglobina y mioglobina, por ejemplo) que facilitan el transporte del O_2. El dióxido de carbono forma ácido carbónico (H_2CO_3) en disolución acuosa y es transportado en forma de ion bicarbonato (HCO_3^-), ya sea en forma libre, el bicarbonato es muy soluble en agua (~100g/L a 25°C), o unido a hemoglobina. Otros tres gases, NH_3, NO y H_2S, también tienen papeles biológicos en algunos organismos; éstos son gases polares que se disuelven fácilmente en el agua y se ionizan en disolución acuosa.

Los compuestos apolares fuerzan cambios energéticamente desfavorables en la estructura del agua

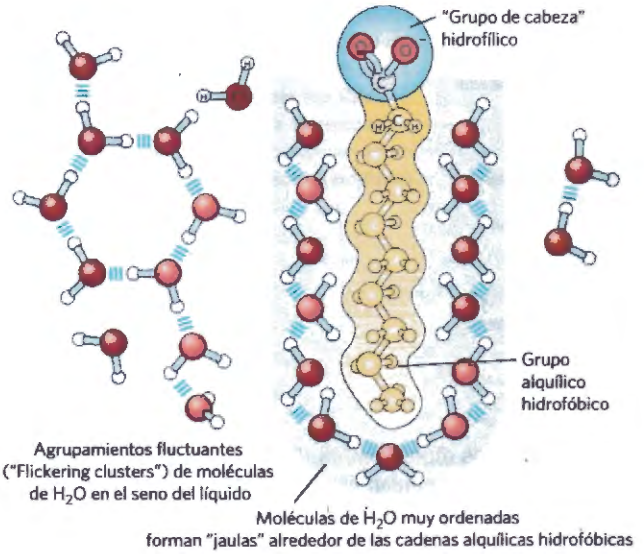
Cuando se mezcla el agua con benceno o hexano, se forman dos fases; ninguno de los dos líquidos es soluble en el otro. Los compuestos apolares tales como el benceno y el hexano son hidrofóbicos, es decir, son incapaces de experimentar interacciones energéticamente favorables con las moléculas de agua y, de hecho, inter-

TABLA 2-3 Solubilidad de algunos gases en agua

Gas	Estructura[a]	Polaridad	Solubilidad en agua (g/L)[b]
Nitrógeno	N≡N	Apolar	0,018 (40 °C)
Oxígeno	O=O	Apolar	0,035 (50 °C)
Dióxido de carbono	δ− ← δ− O=C=O	Apolar	0,97 (45 °C)
Amoníaco	H, H, H, N, δ−	Polar	900 (10 °C)
Sulfuro de hidrógeno	H, H, S, δ−	Polar	1,860 (40 °C)

[a]Las flechas representan dipolos eléctricos; existe una carga negativa parcial (δ−) en la punta de la flecha y una carga parcial positiva (δ+; no mostrada aquí) en la cola.

[b]Obsérvese que las moléculas polares se disuelven, incluso a bajas temperaturas, mucho mejor que las moléculas apolares a temperaturas relativamente elevadas.



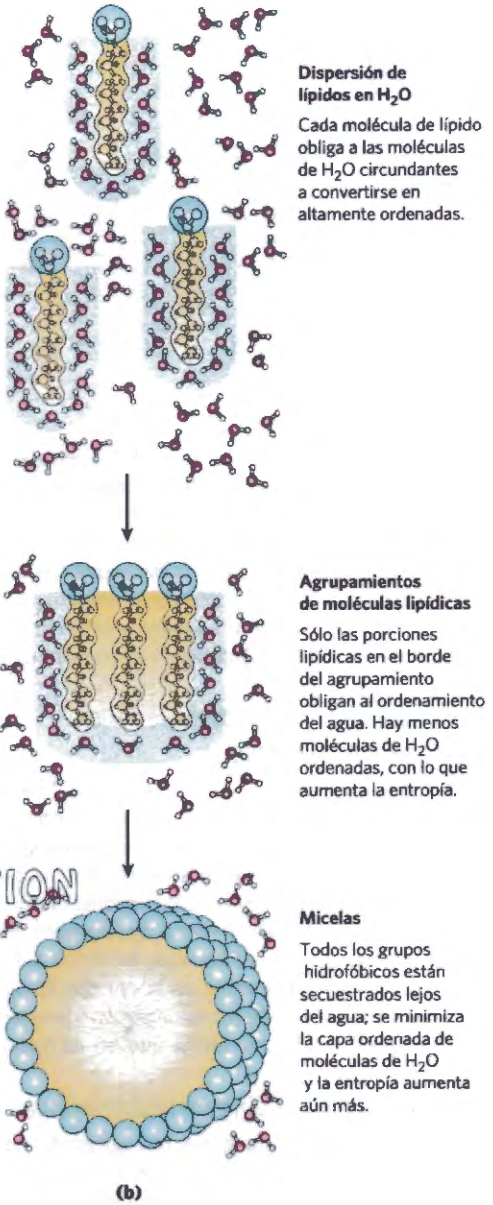


FIGURA 2-7 Compuestos anfipáticos en disolución acuosa. (a) Los ácidos grasos de cadena larga tienen cadenas alquílicas muy hidrofóbicas, cada una de las cuales está rodeada por una capa de moléculas de agua altamente ordenadas. **(b)** Agrupándose en micelas, las moléculas de ácido graso exponen al agua la mínima superficie hidrofóbica posible y se necesitan menos moléculas de agua en la capa de agua ordenada. La micela se estabiliza gracias a la energía ganada en la liberación de moléculas de agua inmovilizadas.

COPY-STATION

fieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua. Todas las moléculas o iones en disolución acuosa interfieren con los enlaces de hidrógeno de algunas moléculas de agua en su proximidad inmediata, pero los solutos cargados o polares (tales como el NaCl) compensan esta pérdida de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua mediante la formación de nuevas interacciones entre el soluto y el agua. El cambio neto de entalpía (ΔH) a causa de la disolución de estas sustancias es generalmente pequeño. Los solutos hidrofóbicos no ofrecen esta compensación por lo que su adición al agua puede resultar, por tanto, en un pequeño aumento de entalpía; la rotura de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua toma energía del sistema por lo que es necesario adquirir energía del entorno. Además de requerir esta entrada de energía, la disolución de solutos hidrofóbicos en el agua da lugar a un descenso evidente de entropía. Las moléculas de agua en la vecindad inmediata de un soluto apolar están restringidas en sus orientaciones posibles ya que forman una capa en forma de jaula de moléculas de agua muy ordenada alrededor de cada molécula de soluto. Estas moléculas de agua no están tan altamente orientadas como las de los **clatratos**, compuestos cristalinos de un soluto apolar y agua, pero el efecto es el mismo en ambos casos: el ordenamiento en las moléculas de agua reduce la entropía. El número de moléculas de agua ordenadas, y por tanto la magnitud del descenso de entropía, es proporcional al área superficial del soluto hidrofóbico rodeado por la jaula de moléculas de agua. La variación de energía libre que conlleva la disolución de un soluto apolar en agua es, por tanto, desfavorable: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, en donde ΔH tiene un valor positivo, ΔS un valor negativo y ΔG es positivo.

Los compuestos **anfipáticos** contienen regiones que son polares (o cargadas) y regiones que son apolares (Tabla 2-2). Cuando se mezcla un compuesto anfipático con agua, la región polar hidrofílica, interacciona favorablemente con el agua y tiende a disolverse, pero la región apolar hidrofóbica, tiende a evitar el contacto con el agua **(Fig. 2-7a)**. Las regiones apolares de las moléculas se agrupan para presentar la menor área hidrofóbica posible al disolvente acuoso mientras que las regiones polares se disponen de forma que se maximice su interacción con el disolvente acuoso (Fig. 2-7b), un fenómeno conocido como **efecto hidrofóbico**. Estas estructuras estables de compuestos anfipáticos en agua, denominadas **micelas**, pueden contener cientos o miles de moléculas. Las fuerzas que mantienen juntas las regiones apolares de las moléculas se denominan **interacciones hidrofóbicas**, a pesar de que esta terminología puede resultar confusa porque la fuerza de la interacción no es debida a ningún tipo de

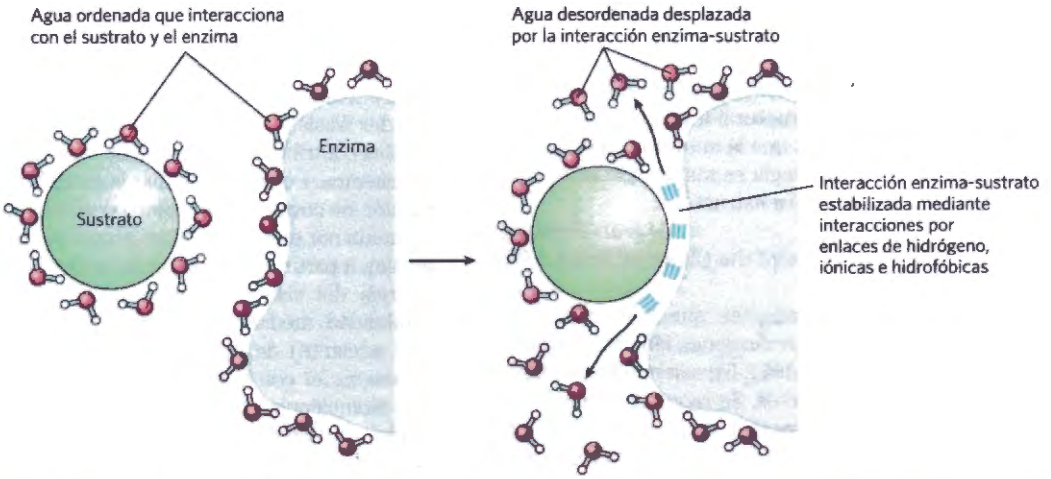


FIGURA 2-8 La liberación de agua ordenada favorece la formación de un complejo enzima-sustrato. Cuando están separados, tanto el enzima como el sustrato fuerzan a las moléculas de agua cercanas a formar una capa ordenada. La unión del sustrato al enzima libera parte del agua ordenada, y el aumento de entropía resultante proporciona un "empujón" termodinámico a la formación del complejo enzima-sustrato (véase la p. 196).

atracción intrínseca entre las regiones no polares. Son, en realidad, el resultado de que el sistema ha alcanzado la máxima estabilidad termodinámica al minimizar el número de moléculas de agua ordenadas que son necesarias para rodear las regiones hidrofóbicas de las moléculas de soluto.

Muchas biomoléculas son anfipáticas; las proteínas, pigmentos, ciertas vitaminas y los esteroles y fosfolípidos de las membranas tienen regiones con superficies polares y apolares. Las estructuras formadas por estas moléculas se estabilizan mediante el efecto hidrofóbico, que favorece la agregación de las regiones no polares. El efecto hidrofóbico en las interacciones entre lípidos y entre lípidos y proteínas es el determinante más importante de la estructura de las membranas biológicas. La agregación de los aminoácidos apolares en el interior de la proteínas, dirigida por el efecto hidrofóbico, estabiliza también las estructuras tridimensionales de las proteínas.

La formación de enlaces de hidrógeno entre el agua y los solutos polares también produce un cierto ordenamiento de las moléculas de agua, pero el efecto es menos significativo que con los solutos apolares. Parte de la fuerza impulsora de la unión de un sustrato polar (reactivo) a la superficie polar complementaria de un enzima procede de la disrupción del orden entre moléculas de agua: la entropía aumenta a medida que el enzima desplaza moléculas de agua ordenadas alrededor del sustrato y que el sustrato desplaza de manera recíproca moléculas de agua ordenadas en la superficie del enzima **(Fig. 2-8)**.

Las interacciones de van der Waals son atracciones interatómicas débiles

Cuando dos átomos no cargados se encuentran muy cerca, las nubes electrónicas que los rodean se influyen mutuamente. Variaciones al azar en las posiciones de los electrones alrededor de un núcleo pueden crear un dipolo eléctrico transitorio que induce un dipolo eléctrico opuesto también transitorio en el átomo cercano. Los dos dipolos se atraen débilmente entre sí con lo que los núcleos se acercan más. Estas atracciones débiles se denominan **interacciones de van der Waals** (conocidas también como fuerzas de London). A medida que los dos núcleos se acercan entre sí sus nubes electrónicas empiezan a repelerse. En el punto en que la atracción neta es máxima se dice que los núcleos se encuentran a la distancia de contacto de van der Waals: Cada átomo posee un **radio de van der Waals** característico, que constituye una medida de lo que permitirá a este átomo acercarse a otro (ver Tabla 2-4). En los modelos moleculares "espaciales" que se muestran a lo largo de este libro los átomos se representan con tamaños proporcionales a sus radios de van der Waals.

TABLA 2-4 Radios de van der Waals y radios de enlace covalente (simple) de algunos elementos

Elemento	Radio de van der Waals (nm)	Radio covalente del enlace simple (nm)
H	0,11	0,030
O	0,15	0,066
N	0,15	0,070
C	0,17	0,077
S	0,18	0,104
P	0,19	0,110
I	0,21	0,133

Fuente: Radios de van der Waals: R. Chauvin, *Phys Chem.* 96:9194, 1992. Radios covalentes: L. Pauling, *Nature of the Chemical Bond*, 3ª ed. Cornell University Press, 1960.

Nota: Los radios de van der Waals describen las dimensiones espaciales de los átomos. Cuando dos átomos se unen covalentemente, los radios atómicos en el punto de enlace son menores que los radios de van der Waals porque el par de electrones compartido acerca a los dos átomos. La distancia entre núcleos en una interacción de van der Waals o en un enlace covalente es aproximadamente igual a la suma de los radios de van der Waals o de los radios covalentes, respectivamente, de los dos átomos. De este modo, la longitud de un enlace simple carbono-carbono es de aproximadamente 0,077 nm + 0,077 nm = 0,154 nm.

Las interacciones débiles son cruciales para la estructura y función de las macromoléculas

> Creo que con la progresiva aplicación de los métodos de la química estructural a los problemas fisiológicos, observaremos que la importancia del enlace de hidrógeno en fisiología es mayor que la de cualquier otra característica estructural
>
> *–Linus Pauling,*
> The Nature of the Chemical Bond, *1939*

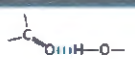
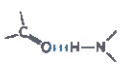
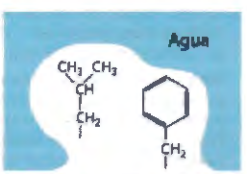
Las interacciones no covalentes que hemos descrito, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals (Tabla 2-5), son mucho más débiles que los enlaces covalentes. Se requiere un aporte de energía de 350 kJ para romper un mol (6×10^{23}) de enlaces C—C simples y de unos 410 kJ para romper un mol de enlaces C—H, pero se requieren solamente unos 4 kJ para destruir un mol de interacciones de van der Waals típicas. Las interacciones impulsadas por el efecto hidrofóbico son también mucho más débiles que los enlaces covalentes, aunque un disolvente de polaridad elevada (una disolución salina concentrada, por ejemplo) las refuerza sustancialmente. Las interacciones iónicas y los enlaces de hidrógeno son de fuerza variable, que depende de la polaridad del disolvente y del grado de alineamiento de los átomos unidos por enlace de hidrógeno, pero son siempre significativamente más débiles que los enlaces covalentes. En un disolvente acuoso a 25°C, la energía térmica disponible puede ser del mismo orden de magnitud que la fuerza de estas interacciones débiles y la interacción entre las moléculas de soluto y de disolvente (agua) es casi tan favorable como las interacciones soluto-soluto. En consecuencia, los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals se forman y rompen continuamente.

Aunque cada uno de estos cuatro tipos de interacciones es individualmente débil en comparación a un enlace covalente, el efecto acumulativo de muchas interacciones de este tipo puede ser muy significativo. Por ejemplo, la unión no covalente de un enzima a su sustrato puede implicar varios enlaces de hidrógeno y una o más interacciones iónicas así como interacciones hidrofóbicas y de van der Waals. La formación de cada uno de estos enlaces débiles contribuye a un descenso neto de la energía libre del sistema. Podemos calcular la estabilidad de una interacción no covalente, tal como la de una molécula pequeña unida por enlaces de hidrógeno a su pareja macromolecular, a partir de la energía de unión, la reducción en la energía del sistema cuando se produce la unión. La estabilidad, medida por la constante de equilibrio (véase más adelante) de la reacción de unión, varía de forma *exponencial* con la energía de unión. La disociación de dos biomoléculas (tales como un enzima y su sustrato unido) asociadas de forma no covalente mediante múltiples interacciones débiles requiere que se destruyan al mismo tiempo todas estas interacciones. Dado que las interacciones fluctúan al azar, tal destrucción simultánea es muy poco probable. La estabilidad molecular conferida por 5 o 20 interacciones débiles es, por tanto, mucho mayor de lo que podría esperarse de una simple adición de las pequeñas energías de unión.

Las macromoléculas tales como las proteínas, el DNA y el RNA contienen tantos sitios potenciales para la formación de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, de van der Waals o hidrofóbicas que el efecto acumulativo del gran número de pequeñas fuerzas de unión puede ser enorme. La estructura más estable (nativa) de las macromoléculas es aquella en que se maximiza el número de uniones débiles. El plegamiento de una cadena polipeptídica o polinucleotídica sencilla en su forma tridimensional viene determinado por este principio. La unión de un antígeno a un anticuerpo específico depende de los efectos acumulativos de muchas interacciones débiles. Como se ha mencionado anteriormente, la energía liberada cuando un enzima se une de manera no covalente a su sustrato es la fuente principal del poder catalítico del enzima. La unión de una hormona o un neurotransmisor a su receptor celular proteico es el resultado de múltiples interacciones débiles. Una consecuencia del gran tamaño de los enzimas y de los receptores (en relación con sus sustratos o ligandos) es que sus grandes superficies proporcionan muchas oportunidades para el establecimiento de interacciones débiles. A nivel molecular, la complementariedad entre biomoléculas que interaccionan entre sí refleja la complementariedad y las interacciones débiles entre grupos polares, cargados e hidrofóbicos en la superficie de las moléculas.

Al determinar la estructura de una proteína como la hemoglobina **(Fig. 2-9)** por cristalografía de rayos X (véase el Recuadro 4-5), resulta frecuente encontrar moléculas de agua unidas tan fuertemente que forman parte de la estructura cristalina; lo mismo ocurre en cristales de RNA o DNA. Estas moléculas de agua unida, detectables también en disolución acuosa mediante resonancia magnética nuclear, poseen propiedades que las distinguen del "grueso" de agua del disolvente. Son, por ejemplo, osmóticamente inactivas (véase más adelante). El agua fuertemente unida es esencial para la función de muchas proteínas. En una de las reacciones clave del proceso de la fotosíntesis, por ejemplo, se produce un flujo de protones a través de una membrana biológica mientras la energía de la luz genera un flujo de

TABLA 2-5 Cuatro tipos de interacciones no covalentes ("débiles") entre biomoléculas en disolución acuosa

Enlaces de hidrógeno	
Entre grupos neutros	
Entre enlaces peptídicos	
Interacciones iónicas	
Atracción	
Repulsión	
Interacciones hidrofóbicas	
Interacciones de van der Waals	Dos átomos cualesquiera muy próximos

Copy Station

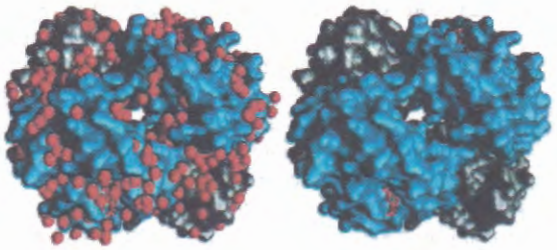


FIGURA 2-9 Unión del agua en la hemoglobina. La estructura cristalina de la hemoglobina (PDB ID 1A3N) se muestra en **(a)** con sus moléculas de agua unidas (esferas rojas) y en **(b)** sin las moléculas de agua. Las moléculas de agua se hallan tan firmemente unidas a la proteína que afectan al patrón de difracción de rayos X como si formaran partes fijas del cristal. Las dos subunidades α de la hemoglobina se muestran en color gris y las dos subunidades β en azul. Cada subunidad tiene unido un grupo hemo (estructura de varillas roja), que sólo es visible en las subunidades β en esta figura. La estructura y función de la hemoglobina se discuten detalladamente en el Capítulo 5. [Fuente: PDB ID 1A3N, J. R. H. Tame y B. Vallone, *Acta Crystallog. D* 56:805, 2000.]

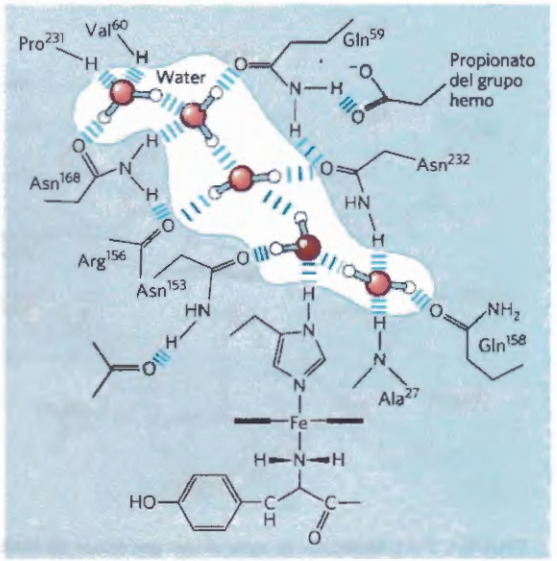


FIGURA 2-10 Cadena de agua en el citocromo *f*. Hay agua unida en el canal de protones de la proteína de membrana citocromo *f*, que forma parte de la maquinaria recolectora de energía de la fotosíntesis en cloroplastos (véase la Fig. 20-21). Cinco moléculas de agua están unidas mediante enlaces de hidrógeno entre ellas y con grupos funcionales de la proteína: los átomos de cadena principal de residuos de valina, prolina, arginina y alanina y las cadenas laterales de tres residuos asparagina y dos residuos glutamina. La proteína tiene un grupo hemo unido (véase la Fig. 5-1) que, mediante su átomo de hierro, facilita el flujo de electrones durante la fotosíntesis. El flujo electrónico está acoplado al movimiento de protones a través de la membrana, lo que probablemente implica que tenga lugar un "salto de protones" (véase la Fig. 2-14) a lo largo de esta cadena de moléculas de agua unidas. [Fuente: Información de P. Nicholls, *Cell Mol. Life Sci.* 57:987, 2000, Fig. 6a (editada a partir de PDB ID 1HCZ, S.E. Martínez et al., *Prot. Sci.* 5:1081, 1996.]

electrones a través de una serie de proteínas transportadoras (véase la Fig. 20-21). Una de estas proteínas, el citocromo *f*, tiene unida una cadena de cinco moléculas de agua **(Fig. 2-10)** que posiblemente proporcionan una vía para el movimiento de los protones a través de la membrana según un proceso conocido como "salto de protones" (que se describe a continuación). Casi con toda seguridad, otra bomba de protones que utiliza la energía de la luz, la bacteriorrodopsina, usa una cadena de moléculas de agua unidas y orientadas de una forma precisa para el movimiento transmembrana de protones (véase la Fig. 20-29b). Moléculas de agua fuertemente unidas pueden ser también parte esencial del sitio de unión de una proteína y su ligando. Por ejemplo, en una proteína bacteriana de unión a arabinosa, cinco moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno que permiten la formación de enlaces críticos cruzados entre el azúcar (arabinosa) y los residuos de aminoácidos del sitio de unión de azúcares **(Fig. 2-11)**.

Los solutos afectan a las propiedades coligativas de las disoluciones acuosas

Los solutos de cualquier tipo alteran ciertas propiedades físicas del agua disolvente: su presión de vapor, punto de ebullición, punto de fusión (punto de congelación), y presión osmótica. Éstas se denominan **propiedades coligativas** (coligativas significa "ligadas") puesto que el efecto de los solutos sobre estas cuatro propiedades tiene la misma base: la concentración del agua es menor en las disoluciones que en el agua pura. El efecto de la concentración de soluto sobre las propiedades coligativas del agua es independiente de las propiedades químicas del soluto; depende únicamente del *número* de partículas de soluto (moléculas o iones) en una determinada cantidad de agua. Por ejemplo, un compuesto tal como el NaCl, que se disocia en disolución, tiene un efecto doble sobre la presión osmótica que es el doble que el de un número idéntico de moles de un soluto que no se disocie como, por ej., la glucosa.

Las moléculas de agua tienden a trasladarse desde una región de elevada concentración de agua a una de concentración inferior, de acuerdo con la tendencia natural de un sistema al desorden. Cuando dos disoluciones acuosas diferentes están separadas por una membrana semipermeable (que deja pasar moléculas de agua pero no del soluto), las moléculas de agua que difunden de la región de alta concentración de agua hacia la de concentración de agua menor producen presión osmótica **(Fig. 2-12)**. El valor aproximado de esta presión, Π, medida como la fuerza necesaria para oponerse al movimiento del agua (Fig. 2-12c), viene dado por la ecuación de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

en la que R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. El símbolo i es el factor de van't Hoff, que es una medida del grado de disociación del soluto en dos o más especies iónicas. El término ic es la **osmolaridad** de la disolución, el producto del factor de van't Hoff i y la concentración molar de soluto c. En disoluciones diluidas de NaCl, el soluto se disocia completamente en iones Na^+ y Cl^-, doblando el número de partículas de soluto, de modo que $i = 2$. En todos los solutos no ionizables, $i = 1$. Para disoluciones de varios (n) solutos, Π es la suma de las contribuciones de cada especie:

$$\Pi = RT\,(i_1c_1 + i_2c_2 + \ldots + i_nc_n)$$

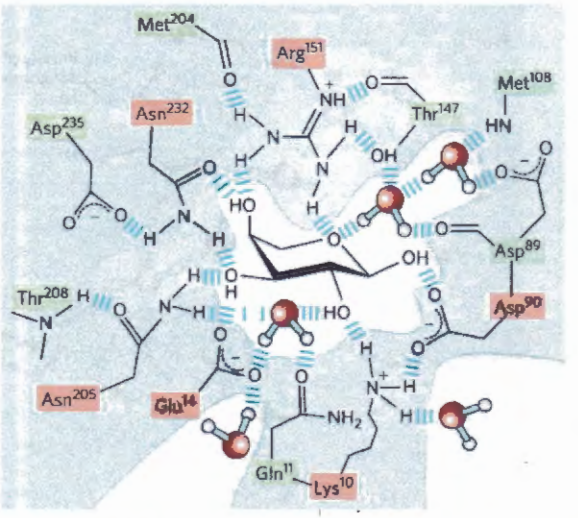


FIGURA 2-11 Moléculas de agua unidas por enlace de hidrógeno como parte de un sitio de unión de glúcidos en una proteína. En la proteína de unión a L-arabinosa de la bacteria *E. coli*, cinco moléculas de agua son componentes esenciales de la red de interacciones mediante enlaces de hidrógeno formada entre el azúcar arabinosa (centro) y no menos de 13 aminoácidos del sitio de unión de azúcares. Vistos en tres dimensiones, estos grupos que interaccionan forman dos capas de unión; los residuos aminoácidos de la primera se representan sombreados en color rojo y los de la segunda en verde. Para mayor claridad, y a pesar de no serlo, algunos de los enlaces de hidrógeno aparecen más largos que otros; en realidad, todos los enlaces tienen la misma longitud. [Fuente: Información de P. Ball *Chem. Rev.* 108:74, 2008, Fig. 16.]

La **ósmosis**, el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable impulsado por diferencias en la presión osmótica, es un factor importante en la vida de la mayoría de las células. Las membranas plasmáticas son más permeables al agua que a la mayor parte del resto de moléculas pequeñas, iones y macromoléculas porque en la membrana hay canales proteicos (acuaporinas; véase la Fig. 11-43) que permiten selectivamente el paso de agua. Se dice que las disoluciones de igual osmolaridad que el citosol celular son **isotónicas** con respecto a esa célula. Una célula rodeada por una disolución isotónica no gana ni pierde agua **(Fig. 2-13)**. En una disolución **hipertónica**, con una osmolaridad mayor que el citosol, la célula se encoge al salir agua hacia fuera. En una disolución **hipotónica**, de osmolaridad menor que el citosol, las células se hinchan al penetrar el agua en ellas. En su medio habitual, las células contienen generalmente concentraciones más elevadas de biomoléculas e iones que sus alrededores, de forma que la presión osmótica tiende a impulsar agua hacia el interior de las células. Si no se equilibrara de alguna forma, este movimiento de agua hacia dentro distendería la membrana plasmática y llegaría a causar la explosión de la célula (lisis osmótica).

A lo largo de la evolución han surgido varios mecanismos que evitan esta catástrofe. En las bacterias y los vegetales, la membrana plasmática está rodeada de una pared celular no expandible de rigidez y fuerza suficientes para resistir la presión osmótica y evitar la lisis osmótica. Algunos protozoos de agua dulce, que viven

COPY-STATION

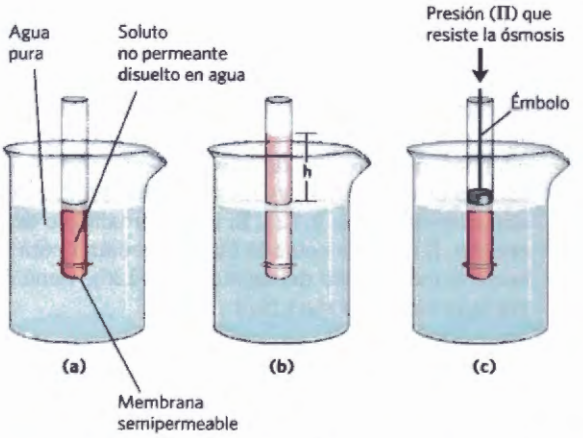


FIGURA 2-12 Ósmosis y medida de la presión osmótica. (a) Estado inicial. El tubo contiene una disolución acuosa, el vaso contiene agua pura, y la membrana semipermeable permite el paso de agua pero no de soluto. El agua fluye desde el vaso hacia el tubo para igualar su concentración a un lado y a otro de la membrana. **(b)** Estado final. Se ha desplazado agua hacia la disolución del compuesto no permeante, diluyéndola y elevando la columna de agua dentro del tubo. En el equilibrio, la fuerza de gravedad que actúa sobre la disolución que hay en el tubo equilibra exactamente la tendencia del agua a moverse hacia el interior del tubo, donde su concentración es menor. **(c)** La presión osmótica (Π) se mide como la fuerza que es necesario aplicar para devolver la solución del tubo de nuevo al nivel de la del vaso. Esta fuerza es proporcional a la altura, *h*, de la columna en (b).

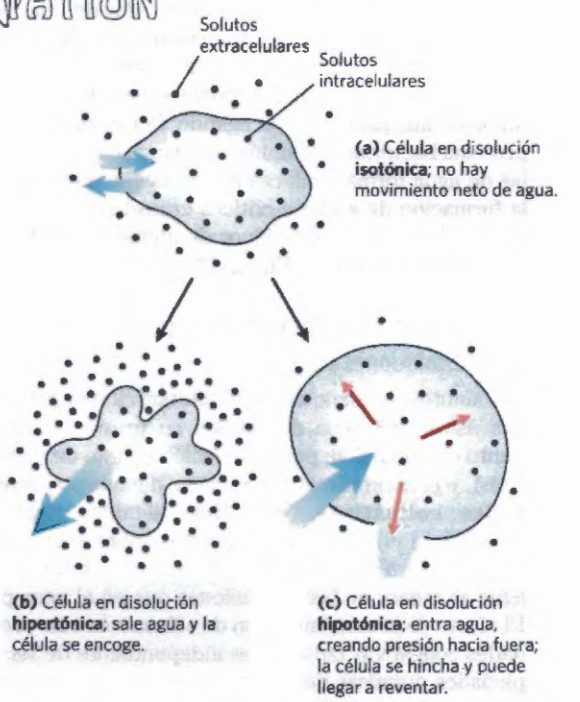


FIGURA 2-13 Efecto de la osmolaridad extracelular sobre el movimiento del agua a través de una membrana plasmática. Cuando una célula en equilibrio osmótico con el entorno que la rodea (esto es, en un medio isotónico) **(a)** se transfiere a una disolución hipertónica **(b)** o a una disolución hipotónica **(c)**, el agua fluye a través de la membrana plasmática en la dirección que tiende a igualar la osmolaridad dentro y fuera de la célula.

en un medio altamente hipotónico, poseen un orgánulo (vacuola contráctil) que bombea agua al exterior de la célula. En animales multicelulares, el plasma sanguíneo y el fluido intersticial (el fluido extracelular de los tejidos) se mantienen a una osmolaridad cercana a la del citosol. La elevada concentración de albúmina y otras proteínas en el plasma sanguíneo contribuye a su osmolaridad. Las células también bombean activamente Na^+ y otros iones hacia el fluido intersticial para permanecer en equilibrio osmótico con su entorno.

Puesto que el efecto de los solutos en la osmolaridad depende del *número* de partículas disueltas, no de su *masa*, las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos) tienen un efecto mucho menor en la osmolaridad de una disolución que la que tendría una misma masa de sus componentes monoméricos. Por ejemplo, un *gramo* de un polisacárido compuesto por 1.000 unidades de glucosa tiene el mismo efecto en la osmolaridad que un *miligramo* de glucosa. El almacenamiento de combustible en forma de polisacáridos (almidón o glucógeno) en vez de como glucosa u otros azúcares simples evita un aumento enorme de la presión osmótica en la célula de depósito.

Las plantas utilizan la presión osmótica para conseguir rigidez mecánica. La muy elevada concentración de soluto en las vacuolas impulsa agua hacia el interior de la célula (Fig. 2-13), pero la pared celular no expandible impide el hinchamiento; en su lugar, se incrementa la presión osmótica resultante contra la pared celular (presión de turgencia), lo que proporciona rigidez a la célula, al tejido y al organismo vegetal. Cuando la lechuga de una ensalada se marchita es debido a que la pérdida de agua ha reducido la presión de turgencia. La ósmosis también tiene consecuencias en los protocolos de laboratorio. Las mitocondrias, cloroplastos y lisosomas, por ejemplo, están rodeados de membranas semipermeables. Para aislar estos orgánulos a partir de células rotas, los bioquímicos deben llevar a cabo los fraccionamientos en disoluciones isotónicas (véase la Fig. 1-9) para evitar la excesiva entrada de agua en los orgánulos que podría producir su hinchamiento y rotura. Los tampones utilizados en los fraccionamientos celulares contienen normalmente concentraciones suficientes de sacarosa o algún otro soluto inerte para proteger los orgánulos de la lisis osmótica.

EJEMPLO PRÁCTICO 2-1 Presión osmótica de un orgánulo I

Suponga que los solutos principales de lisosomas intactos son KCl (~0,1 M) y NaCl (~0,03 M). En un proceso de aislamiento de lisosomas, ¿cuál será la concentración de sacarosa necesaria en la disolución de extracción a temperatura ambiente (25 °C) para evitar el hinchamiento y lisis?

Solución: Queremos hallar una concentración de sacarosa que nos dé una fuerza osmótica igual a la producida por el KCl y el NaCl de los lisosomas. La ecuación para calcular la presión osmótica (la ecuación de van't Hoff) es

$$\Pi = RT\,(i_1c_1 + i_2c_2 + i_3c_3 + \cdots + i_nc_n)$$

donde R es la constante de los gases, 8,315 J/mol·K, T es la temperatura absoluta (Kelvin), c_1, c_2 y c_3 son la concentración molar de cada soluto, e i_1, i_2 e i_3 son el número de partículas que cada soluto genera en disolución (i = 2 para KCl y NaCl).

La presión osmótica del contenido del lisosoma es

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{lisosoma}} &= RT(i_{KCl}c_{KCl} + i_{NaCl}c_{NaCl})\\ &= RT[(2)(0{,}01\text{mol/L}) + (2)(0{,}03\text{ mol/L})]\\ &= RT(0{,}26\text{ mol/L})\end{aligned}$$

La presión osmótica de una disolución de sacarosa viene dada por:

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(i_{\text{sacarosa}}c_{\text{sacarosa}})$$

En este caso, $i_{\text{sacarosa}} = 1$, porque la sacarosa no se ioniza. Por tanto,

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(c_{\text{sacarosa}})$$

La presión osmótica del contenido del lisosoma es igual a la de la disolución de sacarosa cuando

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{sacarosa}} &= \Pi_{\text{lisosoma}}\\ RT(c_{\text{sacarosa}}) &= RT(0{,}26\text{ mol/L})\\ c_{\text{sacarosa}} &= 0{,}26\text{ mol/L}\end{aligned}$$

De modo que la concentración de sacarosa necesaria (FW 342) es (0,26 mol/L)(342 g/mol) = 88,92 g/L. Dado que las concentraciones de soluto sólo son exactas hasta una cifra significativa, c_{sacarosa} = 0,09 kg/L

EJEMPLO PRÁCTICO 2-2 Presión osmótica de un orgánulo II

Suponga que decidimos usar una disolución de un polisacárido, como por ejemplo glucógeno para equilibrar la presión osmótica de los lisosomas (descrita en el Ejemplo Práctico 2-1). Considerando un polímero lineal de 100 unidades de glucosa, calcule la cantidad de este polímero necesaria para conseguir la misma presión osmótica que la disolución de sacarosa del Ejemplo Práctico 2-1. La M_r del polímero de glucosa es ~18.000 y, al igual que la sacarosa, no se ioniza en disolución.

Solución: Como se deducía en el Ejemplo Práctico 2-1,

$$\Pi_{\text{sacarosa}} = RT(0{,}26\text{ mol/L})$$

De manera similar,

$$\Pi_{\text{glucógeno}} = RT(i_{\text{glucógeno}}c_{\text{glucógeno}}) = RT(c_{\text{glucógeno}})$$

Para una disolución de glucógeno con la misma presión osmótica que la disolución de sacarosa,

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{glucógeno}} &= \Pi_{\text{sacarosa}}\\ RT(c_{\text{glucógeno}}) &= RT(0{,}26\text{ mol/L})\\ c_{\text{glucógeno}} &= 0{,}26\text{ mol/L} = (0{,}26\text{ mol/L})\,(18.000\text{ g/mol})\\ &= 4{,}68\text{ kg/L}\end{aligned}$$

O, considerando sólo las cifras significativas, $c_{\text{glucógeno}}$ = 5 kg/L, una concentración absurdamente elevada.

Como veremos más adelante, las células de hígado y músculo no almacenan glúcidos en forma de azúcares

de baja masa molecular tales como glucosa o sacarosa sino en forma de glucógeno, polímero de alta masa molecular. Gracias a ello, la célula puede contener una gran masa de glucógeno sin afectar más que mínimamente la osmolaridad del citosol.

RESUMEN 2.1 Interacciones débiles en los sistemas acuosos

- Las muy diferentes electronegatividades del H y del O hacen del agua una molécula muy polar, capaz de formar enlaces de hidrógeno consigo misma y con sus solutos. Los enlaces de hidrógeno son de vida efímera, principalmente electrostáticos y más débiles que los enlaces covalentes. El agua es un buen disolvente de solutos polares (hidrofílicos), con los que forma enlaces de hidrógeno, y de solutos cargados, con los que interacciona electrostáticamente.
- Los compuestos apolares (hidrofóbicos) no se disuelven bien en el agua; no pueden formar enlaces de hidrógeno con el disolvente y su presencia induce un ordenamiento energéticamente desfavorable de moléculas de agua alrededor de sus superficies hidrofóbicas. Para minimizar la superficie expuesta al agua, los compuestos apolares tales como los lípidos forman agregados (micelas) en los que sus partes hidrofóbicas se hallan secuestradas en el interior, asociándose mediante interacciones hidrofóbicas, y sólo las partes más polares interaccionan con el agua.
- Numerosas interacciones débiles no covalentes influyen decisivamente sobre el plegamiento de macromoléculas tales como proteínas o ácidos nucleicos. Las conformaciones macromoleculares más estables son aquellas en las que se maximiza el número de enlaces de hidrógeno en el interior de la molécula y entre la molécula y el disolvente, y en las que las regiones hidrofóbicas se agrupan en el interior de la molécula, lejos del disolvente acuoso.
- La concentración de los solutos tiene una gran influencia sobre las propiedades físicas de las disoluciones acuosas. Cuando se separan dos compartimientos acuosos mediante una membrana semipermeable (como la membrana plasmática que separa la célula de su entorno), el agua fluye a través de esta membrana hasta igualar la osmolaridad de los dos compartimientos. Esta tendencia del agua a fluir a través de la membrana semipermeable produce la presión osmótica.

2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

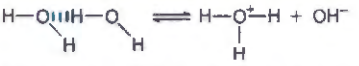
Aunque gran parte de las propiedades del agua como disolvente se pueden explicar en función de la molécula neutra de H_2O, debe tenerse también en cuenta el pequeño grado de ionización del agua en iones hidrógeno (H^+) e iones hidroxilo (OH^-). Al igual que todas las reacciones reversibles, se puede describir la ionización del agua mediante una constante de equilibrio. Cuando se disuelven ácidos débiles en agua, su ionización aporta H^+; las bases débiles consumen H^+ al protonarse. Estos procesos están también gobernados por constantes de equilibrio. La concentración total de ion hidrógeno se puede medir experimentalmente y se expresa como el pH de la solución. Para predecir el estado de ionización de los solutos en agua, hemos de tener en cuenta las constantes de equilibrio pertinentes para cada reacción de ionización. A continuación discutiremos brevemente la ionización del agua y de los ácidos y bases débiles disueltos en ella.

El agua pura está ligeramente ionizada

Las moléculas de agua tienen una ligera tendencia a ionizarse reversiblemente dando un ion hidrógeno (protón) y un ion hidroxilo, dando el equilibrio

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

Aunque normalmente se muestra el producto de disociación del agua como H^+, los protones libres no existen en disolución; los iones hidrógeno formados en el agua son inmediatamente hidratados a **iones hidronio** (H_3O^+). La formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua hace que la hidratación de los protones disociados sea virtualmente instantánea:



La ionización del agua puede medirse a partir de su conductividad eléctrica; el agua pura conduce la corriente eléctrica al migrar H_3O^+ hacia el cátodo y OH^- hacia el ánodo. El movimiento de los iones hidronio e hidroxilo en un campo eléctrico es extremadamente rápido en comparación con el de otros iones como el Na^+, K^+, y Cl^-. Esta elevada movilidad iónica es el resultado del "salto de protones" que se muestra en la **Figura 2-14**. Ningún protón individual se mueve muy lejos a través de la disolución, pero una serie de saltos de protones entre moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno es la causa del movimiento *neto* de un protón a una gran distancia en un tiempo notablemente corto. (El OH^- también se mueve rápidamente mediante salto de protones, pero en la dirección opuesta). Como resultado de la elevada movilidad iónica del H^+, las reacciones ácido-base en disolución acuosa son, en general, excepcionalmente rápidas. Como se ha visto anteriormente, es muy probable que el salto de protones también desempeñe un papel en las reacciones biológicas de transferencia de protones (Fig. 2-10; véase también la Fig. 20-29b).

Puesto que la ionización reversible es crucial para el papel del agua en la función celular, debemos disponer de una manera de expresar el grado de ionización del agua en términos cuantitativos. Un breve repaso de algunas propiedades de las reacciones químicas reversibles nos mostrará cómo podemos hacerlo.

La posición del equilibrio de cualquier reacción química viene dada por su **constante de equilibrio, K_{eq}** (a veces expresada simplemente como K). Para la reacción general

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

se puede definir la constante de equilibrio K_{eq} en función de la concentración de los reactivos (A y B) y de los productos (C y D) presentes en el equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

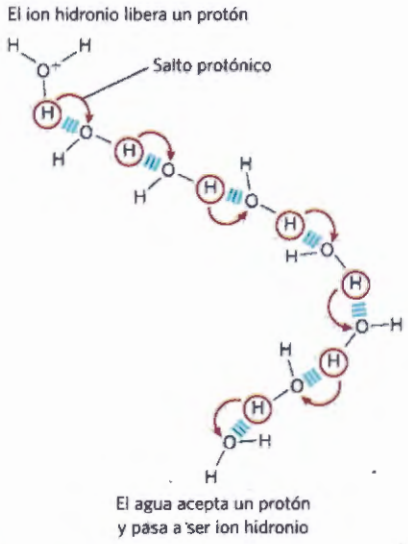


FIGURA 2-14 Salto de protones. "Saltos" de protones a corta distancia a través de una serie de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno dan como resultado el movimiento neto extremadamente rápido de un protón a una gran distancia. Cuando un ion hidronio (parte superior izquierda) cede un protón, una molécula de agua a una cierta distancia (abajo) adquiere uno, convirtiéndose en un ion hidronio. El salto de protones es mucho más rápido que la auténtica difusión y explica la extraordinariamente rápida movilidad iónica de los iones H^+ comparada con otros cationes monovalentes tales como el Na^+ o K^+.

De modo riguroso, los términos de concentración deberían ser las *actividades*, o concentraciones efectivas en disoluciones no ideales, de cada especie. Sin embargo, excepto en cálculos muy precisos, se puede llegar a una aproximación de la constante de equilibrio midiendo las *concentraciones* en el equilibrio. Por razones que escapan a esta discusión, las constantes de equilibrio son adimensionales. Sin embargo, en las expresiones de equilibrio utilizadas en este libro hemos mantenido en general las unidades de concentración (M) para recordar que la molaridad es la unidad de concentración que se utiliza en el cálculo de K_{eq}.

La constante de equilibrio es fija y característica para cada reacción química a una temperatura dada. Define la composición de la mezcla final en el equilibrio, independientemente de las cantidades iniciales de reactivos y productos. De modo inverso, podemos calcular la constante de equilibrio de una reacción dada a una temperatura determinada si se conocen las concentraciones en el equilibrio de todos los reactivos y productos. Como hemos visto en el Capítulo 1, la variación estándar de energía libre (ΔG°) está relacionada directamente con el $\ln K_{eq}$.

La ionización del agua se expresa mediante una constante de equilibrio

El grado de ionización del agua en el equilibrio (Ec. 2-1) es bajo; a 25 °C aproximadamente tan sólo dos de cada 10^9 moléculas en agua pura están ionizadas en un momento dado. La constante de equilibrio para la ionización reversible del agua es

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (2\text{-}3)$$

En agua pura a 25 °C, la concentración del agua es de 55,5 M (gramos de H_2O en 1 L divididos por la masa molecular en gramos: (1.000 g/L)/(18,015 g/mol)), y es esencialmente constante en relación a las bajísimas concentraciones de H^+ y OH^- que son de 1×10^{-7} M. De acuerdo con ello podemos sustituir el denominador de la expresión de la constante de equilibrio por 55,5 M (Ec. 2-3) que da

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[55{,}5\ \text{M}]}$$

Reordenando,

$$(55.5\ \text{M})(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \qquad (2\text{-}4)$$

donde K_w designa el producto $(55{,}5\ \text{M})(K_{eq})$, denominado **producto iónico del agua** a 25 °C.

El valor de K_{eq}, determinado mediante medidas de conductividad eléctrica del agua pura, es $1{,}8 \times 10^{-16}$ M a 25 °C. La sustitución de este valor de K_{eq} en la Ecuación 2-4 da el valor del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ \text{M})(1{,}8 \times 10^{-16}\ \text{M}) = 1{,}0 \times 10^{-14}\ \text{M}^2$$

Así el producto $[H^+][OH^-]$ en disoluciones acuosas a 25 °C es siempre igual a $1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2$. Cuando las concentraciones de H^+ y OH^- son exactamente iguales, tal como sucede en el agua pura, se dice que la solución está a **pH neutro**. A este pH, se puede calcular la concentración de H^+ y OH^- a partir del producto iónico del agua de la manera siguiente

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2 = [OH^-]^2$$

Despejando $[H^+]$ da

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}$$
$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}\ \text{M}$$

Dado que el producto iónico del agua es constante, siempre que $[H^+]$ sea mayor que 1×10^{-7} M, [OH-] será menor que 1×10^{-7} M, y viceversa. Cuando la $[H^+]$ es muy alta, como es el caso de una solución de ácido clorhídrico, [OH-] ha de ser muy pequeña. A partir del producto iónico del agua podemos calcular $[H^+]$ si conocemos [OH-], y viceversa.

EJEMPLO PRÁCTICO 2-3 Cálculo de $[H^+]$

¿Cuál es la concentración de H^+ en una disolución de NaOH 0,1 M?

Solución: Empezamos con la ecuación del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Siendo $[OH^-] = 0{,}1$ M, obtenemos $[H^+]$

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}{0.1\ \text{M}} = \frac{10^{-14}\ \text{M}^2}{10^{-1}\ \text{M}} = 10^{-13}\ \text{M}$$

EJEMPLO PRÁCTICO 2-4 Cálculo de $[OH^-]$

¿Cuál es la concentración de OH- en una disolución en la que la concentración de H^+ es $1{,}3 \times 10^{-4}$ M?

Solución: Empezamos con la ecuación del producto iónico del agua:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Siendo $[H^+] = 1{,}3 \times 10^{-4}$ M, obtenemos $[OH^-]$

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ M^2}{0{,}00013\ M} = \frac{10^{-14}\ M^2}{1{,}3 \times 10^{-4}\ M}$$

$$= 7{,}7 \times 10^{-11}\ M$$

Como en este caso, y en todos los cálculos hay que asegurarse de redondear la respuesta al número correcto de cifras significativas.

La escala de pH representa las concentraciones de H^+ y OH^-

El producto iónico del agua, K_w, es la base de la **escala de pH** (Tabla 2-6). Constituye una manera conveniente de designar la concentración de H^+ (y por consiguiente de OH^-) en cualquier disolución acuosa entre 1,0 M de H^+ y 1,0 M de OH^-. El término **pH** se define mediante la expresión

$$pH = \log\frac{1}{[H^+]} = -\log[H^+]$$

El símbolo p denota "logaritmo negativo de". Para una solución exactamente neutra a 25 °C, en la que la concentración de los iones hidrógeno es $1{,}0 \times 10^{-7}$ M, se puede calcular el pH de la manera siguiente:

$$pH = \log\frac{1}{1{,}0 \times 10^{-7}} = 7{,}0$$

TABLA 2-6 La escala de pH

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH[a]
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

[a]A veces se utiliza la expresión pOH para describir la basicidad, o concentración de OH–, de una solución; el pOH se define por la expresión pOH = -log[OH–], que es análoga a la expresión para el pH. Obsérvese que en todos los casos, pH + pOH = 14

Observe que la concentración de H^+ se debe expresar en términos de molaridad (M).

El valor de 7 para el pH de una disolución exactamente neutra no es una cifra escogida de manera arbitraria; proviene del valor absoluto del producto iónico del agua a 25 °C, que por una feliz coincidencia es un número entero. Las disoluciones que tienen un pH superior a 7 son alcalinas o básicas y en ellas la concentración de OH^- es mayor que la de H^+. Inversamente, las disoluciones con un pH inferior a 7 son ácidas.

Recuerde que la escala de pH es logarítmica, no aritmética. Decir que el pH de dos soluciones difiere en 1 unidad de pH significa que una solución tiene una concentración de H^+ diez veces superior a la de la otra, pero no nos dice cuál es el valor absoluto de la diferencia. La **Figura 2-15** indica el pH de algunos fluidos acuosos comunes. Una bebida de cola (pH 3,0) o un vino tinto (pH 3,7) tienen una concentración de H^+ aproximadamente 10.000 veces superior a la de la sangre (pH 7,4).

Se puede medir aproximadamente el pH de una solución acuosa utilizando diversos colorantes indicadores, entre ellos el tornasol, la fenolftaleína y el rojo fenol, que experimentan cambios de color cuando se disocia un protón de la molécula de colorante. Las determinaciones precisas de pH en el laboratorio químico o clínico se hacen con un electrodo de vidrio que es selectivamente sensible a la concentración de H^+ pero que es insensible al Na^+, K^+ y otros cationes. En un pH-metro se amplifica la señal de un electrodo de vidrio colocado en la disolución a ensayar y se compara con la señal generada por una disolución cuyo pH se conoce con exactitud.

Copy Station

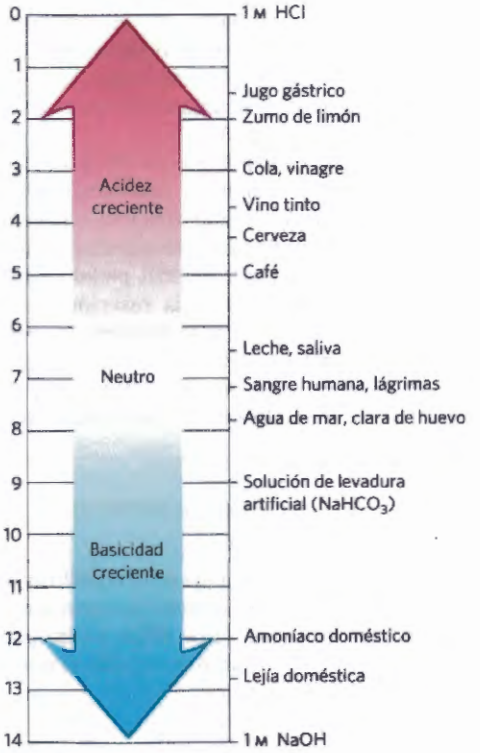


FIGURA 2-15 pH de algunos fluidos acuosos.

La medición del pH es una de las operaciones más importantes y más frecuentemente utilizadas en bioquímica. El pH afecta la estructura y actividad de macromoléculas biológicas; por ejemplo la actividad catalítica de los enzimas depende fuertemente del pH (véase la Fig. 2-22). La medida del pH de la sangre y de la orina se utilizan normalmente en el diagnóstico médico. El pH del plasma sanguíneo de las personas con diabetes grave no controlada, por ejemplo, es con frecuencia inferior al valor normal de 7,4; este estado se conoce como **acidosis** (más adelante se describirá con mayor detalle). En otros estados patológicos el pH de la sangre es superior al normal, estado que se denomina **alcalosis**. La acidosis y la alcalosis extremas pueden poner en peligro la vida. ■

Los ácidos y bases débiles tienen constantes de disociación características

Los ácidos clorhídrico, sulfúrico y nítrico, denominados comúnmente ácidos fuertes, están completamente ionizados en soluciones acuosas diluidas; las bases fuertes NaOH y KOH también están ionizadas completamente. De mayor interés para los bioquímicos es el comportamiento de los ácidos y bases débiles, los que no están completamente ionizados al disolverse en el agua. Estos compuestos forman parte de todos los sistemas biológicos y juegan papeles importantes en el metabolismo y su regulación. Se comprenderá mejor el comportamiento de las disoluciones acuosas de los ácidos y bases débiles si definimos primero algunos términos.

Se pueden definir los ácidos como dadores de protones y las bases como aceptores de protones. Cuando un dador de protones como el ácido acético (CH_3COOH) pierde un protón se transforma en su correspondiente aceptor de protones, que en este caso es el anión acetato (CH_3COO^-). Un dador de protones y su correspondiente aceptor forman un **par ácido-base conjugado (Fig. 2-16)**, relacionados por la reacción reversible

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Cada ácido tiene una tendencia característica a perder su protón en disolución acuosa. Cuanto más fuerte sea el ácido mayor será la tendencia a perder su protón. La tendencia de cualquier ácido (HA) a perder un protón y formar su base conjugada (A^-) se define mediante la constante de equilibrio (K_{eq}) de la reacción reversible

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

para la que

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

Las constantes de equilibrio de las reacciones de ionización se suelen denominar **constantes de ionización** o **constantes** ácidas **de disociación**, a menudo designadas como K_a. En la **Figura 2-16** se dan las constantes de disociación de algunos ácidos. Los ácidos más fuer-

COPY-STATION

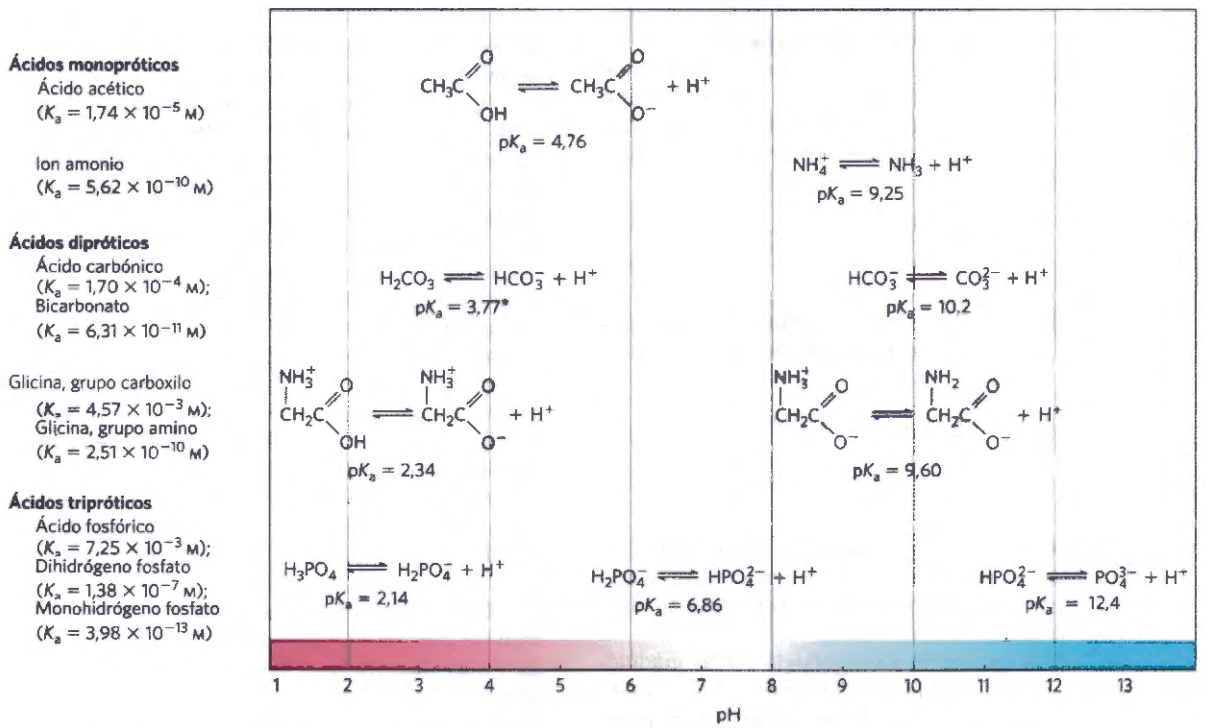


FIGURA 2-16 Un par ácido-base conjugado consiste en un dador de protones y un aceptor de protones. Algunos compuestos, como el ácido acético y el amoníaco, son monopróticos; pueden ceder solamente un protón. Otros son dipróticos (ácido carbónico y glicina) o tripróticos (ácido fosfórico). Se muestran las reacciones de disociación para cada par en donde tienen lugar a lo largo de un gradiente de pH. Para cada reacción se muestra la constante de equilibrio o disociación (K_a) y su logaritmo negativo, el pK_a. *Véase la explicación de aparentes discrepancias sobre los valores de pK_a del ácido carbónico (H_2CO_3) en la p. 67.

tes, tales como el fosfórico y carbónico, tienen constantes de disociación más altas; los ácidos más débiles, tales como el monohidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}), tienen constantes de disociación más bajas.

En la Figura 2-16 también se incluyen los valores de **pK_a**, una expresión análoga a la del pH y que se define mediante la ecuación

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Cuanto más fuerte sea la tendencia a disociar un protón, más fuerte es el ácido y menor es su pK_a. Como veremos a continuación, se puede determinar fácilmente el pK_a de cualquier ácido débil.

Las curvas de titulación proporcionan el pK_a de los ácidos débiles

La titulación se utiliza para determinar la cantidad de un ácido en una disolución dada. Un volumen determinado de ácido se titula con una disolución de concentración conocida de una base fuerte, normalmente hidróxido sódico (NaOH). Se va añadiendo NaOH en pequeñas cantidades hasta que se consume (neutraliza) todo el ácido, lo que se determina mediante el uso de un colorante indicador o con un aparato medidor de pH. Se puede calcular la concentración de ácido en la disolución original a partir del volumen y la concentración de NaOH añadido. En las titulaciones, las cantidades de ácido y base se suelen expresar en forma de equivalentes, siendo un equivalente la cantidad de sustancia que reaccionará con, o producirá un mol de iones hidrógeno, en una reacción ácido-base.

De la gráfica que representa el pH frente a la cantidad de NaOH añadido (**curva de titulación**) se deduce el pK_a del ácido débil. Consideremos la titulación de una disolución 0,1 M de ácido acético con NaOH 0,1 M a 25 °C (**Fig. 2-17**). En el proceso están implicados dos equilibrios reversibles (para simplificar, el ácido acético se denomina aquí HAc):

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (2\text{-}5)$$

$$HAc \rightleftharpoons H^+ + Ac^- \qquad (2\text{-}6)$$

Los equilibrios deben cumplir simultáneamente sus constantes de equilibrio características que son, respectivamente,

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}\ M^2 \qquad (2\text{-}7)$$

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \times 10^{-5}\ M \qquad (2\text{-}8)$$

Al principio de la titulación, antes de añadir NaOH, el ácido acético ya está ligeramente ionizado, en un grado que se puede calcular a partir de su constante de disociación (Ec. 2-8)

A medida que se va incorporando NaOH gradualmente, el OH^- adicionado se combina con el H^+ libre en la disolución formando H_2O para satisfacer la relación de equilibrio de la Ecuación 2-7. A medida que se elimina H^+ libre, el HAc se disocia más para satisfacer su propia constante de equilibrio (Ec. 2-8). El resultado neto a medida que progresa la titulación es que se ioniza más y más HAc, formando Ac-, según se va añadiendo NaOH. En el punto medio de la titulación, en la que se han añadido exactamente 0,5 equivalentes de NaOH por equivalente de ácido, se ha disociado la mitad del ácido acético original, de modo que la concentración del dador de protones, [HAc], es ahora igual a la del aceptor de protones [Ac-]. En este punto medio se establece una relación muy importante: el pH de la solución equimolar de ácido acético y acetato es exactamente igual al pK_a del ácido acético (pK_a = 4,76; véase Figs. 2-16, 2-17). Pronto quedará clara la base de esta relación, que es válida para todos los ácidos débiles.

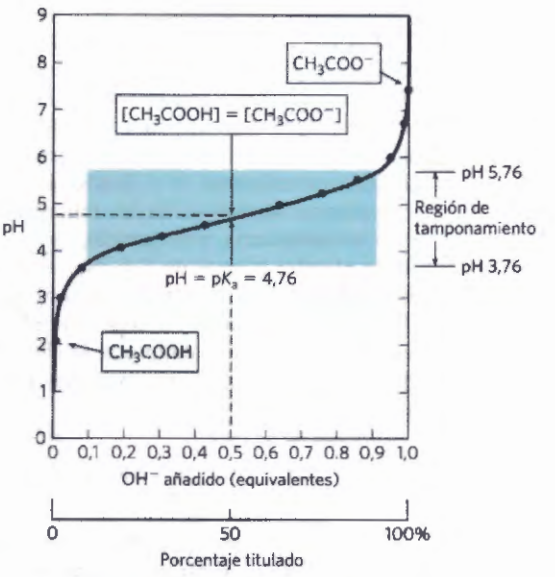


FIGURA 2-17 Curva de titulación del ácido acético. El pH de la mezcla se mide después de cada adición consecutiva de NaOH a la disolución de ácido acético. Este valor se representa frente a la cantidad de NaOH añadido expresada como fracción de la cantidad total de NaOH requerida para convertir todo el ácido acético (CH_3COOH) en su forma desprotonada, el acetato (CH_3COO^-). Los puntos obtenidos de esta manera dan la curva de titulación. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos indicados. En el punto medio de la titulación las concentraciones del dador y del aceptor de protones son iguales y el pH es numéricamente igual al pK_a. La zona sombreada es la región de capacidad tamponante, generalmente entre el 10% y el 90% de la titulación del ácido débil.

A medida que la titulación continúa mediante la adición de mayores cantidades de NaOH, el ácido acético todavía sin disociar se convierte gradualmente en acetato. El punto final de la titulación tiene lugar aproximadamente a pH 7,0: todo el ácido acético ha perdido sus protones, dándolos al OH^- para formar H_2O y acetato. A todo lo largo de la titulación coexisten los dos equilibrios (Ecs. 2-5 y 2-6), cumpliendo cada uno de ellos con su constante de equilibrio.

En la **Fig. 2-18** se comparan las curvas de titulación de tres ácidos débiles con constantes de disociación muy diferentes: el ácido acético (pKa = 4,76); el dihidrógeno fosfato, $H_2PO_4^-$ (pK_a = 6,86) y el ion amonio, NH_4^+ (pK_a = 9,25). Aunque las curvas de titulación de estos ácidos tienen la misma forma, están desplazadas a lo largo del eje de pH debido a que los tres ácidos tienen diferente fuerza. El ácido acético, que tiene la mayor K_a (el pK_a más bajo) de los tres es el más fuerte de los tres ácidos débiles (pierde su protón con más

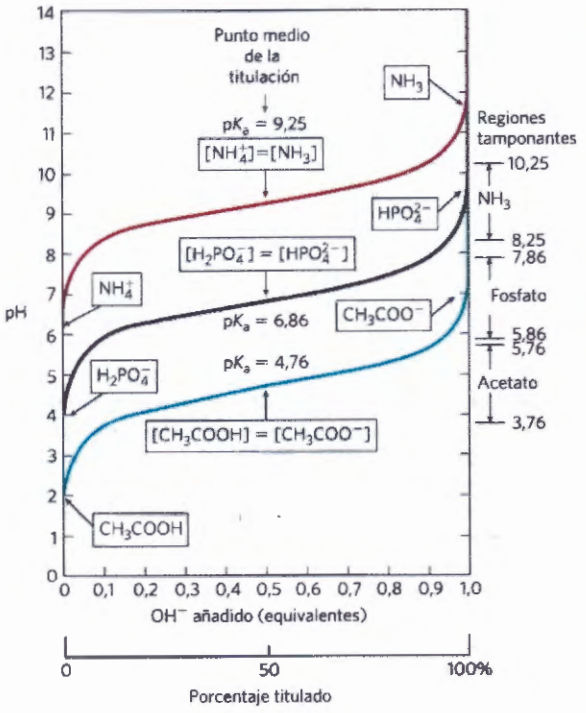


FIGURA 2-18 Comparación de las curvas de titulación de tres ácidos débiles. Se muestran las curvas de titulación de CH_3COOH, $H_2PO_4^-$ y NH_4^+. En los recuadros se muestran las formas iónicas predominantes en los puntos señalados de la titulación. Las regiones con capacidad tamponante están indicadas a la derecha. Los pares ácido-base conjugados son tampones efectivos entre aproximadamente el 10 y el 90% de la neutralización de la especie dadora de protones.

facilidad); a pH 4,76 se encuentra ya semidisociado. El dihidrógeno fosfato pierde un protón con menor facilidad, y está semidisociado a pH 6,86. El ion amonio es el ácido más débil de los tres y no está semidisociado hasta pH 9,25.

La curva de titulación de un ácido débil muestra gráficamente que un ácido débil y su anión, un par ácido-base conjugado, pueden actuar como sustancias tampón, tal como describimos en la sección siguiente.

RESUMEN 2.2 Ionización del agua, ácidos débiles y bases débiles

■ El agua pura está ligeramente ionizada y contiene la misma cantidad de iones hidrógeno (iones hidronio, H_3O^+) e iones hidroxilo. El grado de ionización se describe mediante una constante de equilibrio, $K_{eq} = \dfrac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$, de la que se deduce el producto iónico del agua, K_w. A 25°C, $K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ \text{M})(K_{eq}) = 10^{-14}\ \text{M}^2$.

■ El pH de una disolución acuosa refleja, en escala logarítmica, la concentración de iones hidrógeno:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

■ Cuanto mayor es la acidez de una disolución, menor será su pH. Los ácidos débiles se ionizan parcialmente y liberan un ion hidrógeno, lo que hace disminuir el pH de la disolución acuosa. Las bases débiles aceptan un ion hidrógeno y aumentan el pH. El grado en que se producen estos procesos es característico de cada ácido o base débil particular y se expresa como la constante de disociación:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a.$$

■ El pK_a expresa la fuerza relativa de un ácido o base débiles en escala logarítmica:

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a.$$

■ Cuanto más fuerte sea un ácido, menor será su pK_a; cuanto más fuerte sea la base, mayor su pK_a. El pK_a se puede determinar experimentalmente; es el pH del punto medio de la curva de titulación del ácido o de la base.

2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

Casi todos los procesos biológicos son dependientes del pH; un pequeño cambio en el pH produce un gran cambio en la velocidad del proceso. Esto no sólo es cierto para las muchas reacciones en las que el ion H^+ es un participante directo, sino también para aquellas en las que aparentemente no juega ningún papel. Los enzimas que catalizan las reacciones celulares, y muchas de las moléculas sobre las que actúan, contienen grupos ionizables con valores de pK_a característicos. Los grupos amino y carboxilo protonados de los aminoácidos y el grupo fosfato de los nucleótidos, por ejemplo, funcionan como ácidos débiles; su estado iónico depende del pH del medio que los rodea. (Cuando un grupo ionizable se halla secuestrado dentro de una proteína, lejos del disolvente acuoso, su pK_a, o pK_a aparente, puede ser sensiblemente diferente de su pK_a en agua). Tal como hemos señalado anteriormente, las interacciones iónicas se cuentan entre las fuerzas que estabilizan una molécula de proteína y permiten que un enzima reconozca y se una a su sustrato.

Las células y los organismos mantienen un pH citosólico específico y constante, normalmente cerca de pH 7, que mantiene las biomoléculas en su estado iónico óptimo. En los organismos multicelulares, el pH de los fluidos extracelulares también se mantiene estrechamente regulado. El pH se mantiene constante principalmente gracias a los tampones biológicos, que son mezclas de ácidos débiles y de sus bases conjugadas.

Los tampones son mezclas de ácidos débiles y sus bases conjugadas

Los **tampones** son sistemas acuosos que tienden a resistir cambios en su pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido (H^+) o base (OH^-). Un sistema tampón consiste en un ácido débil (el dador de protones) y su base conjugada (el aceptor de protones). Por ejemplo, una mezcla de igual concentración de ácido

Copyright

acético y de ion acetato, tal como la que se encuentra en el punto medio de la curva de titulación de la Figura 2-17, es un sistema tampón. Observe que la curva de titulación del ácido acético tiene una zona relativamente plana que se extiende alrededor de 1 unidad de pH a cada lado del punto medio de pH, 4,76. Dentro de esta zona una cierta cantidad de H^+ o OH^- añadida al sistema tiene un efecto mucho menor sobre el pH que la misma cantidad añadida fuera de ella. Esta zona relativamente plana es la **región de tamponamiento** del par ácido acético-acetato. En el punto medio de la región de tamponamiento, donde la concentración del dador de protones (ácido acético) es exactamente igual a la del aceptor de protones (acetato), el poder tamponante del sistema es máximo; esto es, se produce el menor cambio de pH cuando se adiciona OH^- o H^+. El pH en este punto de la curva de titulación del ácido acético es igual a su pK_a. El pH del sistema tampón del acetato cambia ligeramente cuando se adiciona una pequeña cantidad de OH^- o de H^+, pero este cambio es muy pequeño si lo comparamos con el cambio de pH que se produciría si se añadiese la misma cantidad de OH^- o H^+ al agua pura o a una disolución de la sal de un ácido fuerte y una base fuerte, tal como el NaCl, que no tiene capacidad tamponante.

El tamponamiento es el resultado de dos equilibrios de reacciones reversibles que tienen lugar en una disolución con concentraciones casi iguales del dador de protones y de su aceptor de protones conjugado. La **Figura 2-19** explica de qué modo funciona el sistema tampón. Siempre que se añade H^+ u OH^- a un tampón, el resultado es un pequeño cambio en el cociente de las concentraciones relativas del ácido débil y de su anión y, por tanto, un pequeño cambio de pH. El descenso en la concentración de un componente del sistema se equilibra exactamente por un incremento del otro. La suma de los componentes del sistema no varía, sólo varía su proporción.

Cada par ácido-base conjugado tiene una zona característica de pH en la que es un tampón eficaz (Fig. 2-18). El par $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tiene un pK_a de 6,86 y, por tanto, puede servir como sistema tampón eficiente entre aproximadamente pH 5,9 y pH 7,9; el par NH_4^+/NH_3, con un pK_a de 9,25, puede actuar como tampón entre aproximadamente pH 8,3 y pH 10,3.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch relaciona pH, pK_a y concentración de tampón

Las curvas de titulación del ácido acético, $H_2PO_4^-$ y NH_4^+ (Fig. 2-18) tienen formas casi idénticas, lo que sugiere que reflejan una ley o relación fundamental. Este es, efectivamente, el caso. La forma de la curva de titulación de cualquier ácido débil está expresada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que es importante para comprender la acción de los tampones y el equilibrio ácido-base en la sangre y tejidos de los vertebrados. Esta ecuación es simplemente una forma útil de enunciar de otro modo la expresión de la constante de ionización de un ácido. En el caso de la ionización de un ácido débil HA, la ecuación de Henderson-Hasselbalch puede deducirse de la forma siguiente:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

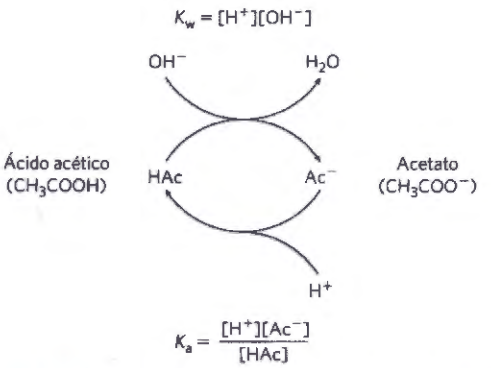


FIGURA 2-19 El par ácido acético-acetato como sistema tampón. El sistema es capaz de absorber H^+ u OH^- a través de la reversibilidad de la disociación del ácido acético. El dador de protones, el ácido acético (HAc), contiene una reserva de H^+ ligado, que puede liberarse para neutralizar una adición de OH^- al sistema, formando H_2O. Esto sucede porque el producto $[H^+][OH^-]$ excede transitoriamente K_w (1×10^{-14} M²). El equilibrio se ajusta rápidamente de modo que este producto sea igual a 1×10^{-14} M² (a 25ºC), reduciendo así transitoriamente la concentración de H^+. Pero ahora el cociente $[H^+][Ac]/[HAc]$ es menor que K_a, por lo que se disocia más HAc para restaurar el equilibrio. De modo semejante, la base conjugada, Ac^-, puede reaccionar con iones H^+ adicionados al sistema; de nuevo las dos reacciones de ionización vuelven simultáneamente al equilibrio. Así un par ácido-base conjugados, tal como el ácido acético y el ion acetato, tienden a resistir un cambio en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o base. La acción tamponante es simplemente la consecuencia de dos reacciones reversibles que tienen lugar simultáneamente y que alcanzan sus puntos de equilibrio según sus constantes de equilibrio, K_w y K_a.

COPY-STATION

Despejando primero $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Tomando el logaritmo negativo en ambos lados de la igualdad:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Sustituyendo $-\log[H^+]$ por pH y $-\log K_a$ por pK_a:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Invirtiendo ahora $-\log[HA]/[A^-]$, lo que implica un cambio signo, se obtiene la **ecuación de Henderson-Hasselbalch**:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2\text{-}9)$$

Esta ecuación se ajusta a la curva de titulación de todos los ácidos débiles y nos permite deducir una serie de relaciones cuantitativas importantes. Por ejemplo, muestra por qué el pK_a de un ácido débil es igual al pH de la solución en el punto medio de su titulación. En este punto $[HA] = [A^-]$ y de ahí

$$pH = pK_a + \log 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

La ecuación de Henderson-Hasselbalch también permite (1) calcular el pK_a a partir del pH y la relación molar entre dador y aceptor de protones; (2) calcular el pH a partir del pK_a y la relación molar entre dador y aceptor

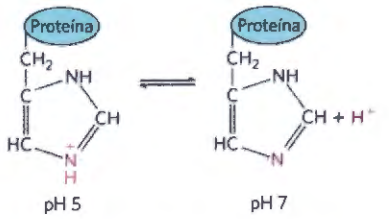


FIGURA 2-20 Ionización de la histidina. El aminoácido histidina, componente de las proteínas, es un ácido débil. El pK_a del nitrógeno protonado de la cadena lateral es 6,0.

de protones; y (3) calcular la relación molar entre dador y aceptor de protones, conocidos el pH y el pK_a.

Ácidos o bases débiles tamponan células y tejidos contra cambios de pH

Los fluidos intracelulares y extracelulares de los organismos multicelulares poseen un pH característico y prácticamente constante. Los sistemas tampón proporcionan la primera línea de defensa del organismo contra los cambios del pH interno. El citoplasma de la mayoría de células contiene elevadas concentraciones de proteínas, las cuales contienen muchos aminoácidos con grupos funcionales que son ácidos débiles o bases débiles. Por ejemplo, la cadena lateral de la histidina **(Fig. 2-20)** tiene un pK_a de 6,0 y puede por tanto existir tanto en la forma protonada como en la no protonada a pH cercano a la neutralidad. Las proteínas que contienen residuos de histidina pueden por tanto tamponar de manera eficiente a pH cercano a la neutralidad.

EJEMPLO PRÁCTICO 2-5 Clonización de la histidina

Calcule la fracción de histidina que tiene su cadena lateral de imidazol protonada a pH 7,3. Los valores de pK_a de la histidina son pK_1 = 1,8, pK_2 (imidazol) = 6,0 y pK_3 = 9,2 (véase la Fig. 3-12b).

Solución: Los tres grupos ionizables de la histidina tienen valores de pK_a suficientemente diferentes para que el primer grupo ácido (—COOH) esté completamente ionizado antes de que el segundo (imidazol protonado) empiece a perder su protón, y el segundo se ioniza completamente antes de que el tercero ($—NH_3^+$) empiece a perder el suyo. (Con la ecuación de Henderson-Hasselbalch podemos demostrar fácilmente que un ácido débil va desde una ionización del 1% a 2 unidades de pH por debajo de su pK_a a una ionización del 99% a dos unidades de pH por encima de su pK_a; véase también la Fig. 3-12b.) A pH 7,3, el grupo carboxilo de la histidina está completamente desprotonado ($—COO^-$) y el grupo α-amino completamente protonado ($—NH_3^+$). Podemos, por tanto, suponer que a pH 7,3 el único grupo que se encuentra parcialmente disociado es el grupo imidazol, que puede estar protonado (abreviado $HisH^+$) o no (His).

Utilizamos la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Sustituyendo pK_2 = 6,0 y pH = 7,3

$$7{,}3 = 6{,}0 + \log \frac{[His]}{[HisH^+]}$$

$$1{,}3 = \log \frac{[His]}{[HisH^+]}$$

$$\text{antilog } 1{,}3 = \frac{[His]}{[HisH^+]} = 2{,}0 \times 10^1$$

Esto nos proporciona la *relación* entre [His] y [$HisH^+$] (20 a 1 en este caso). Queremos convertir este dato en la *fracción* de histidina total que se encuentra en la forma no protonada His a pH 7,3. La fracción es 20/21 (20 partes de His por una parte de $HisH^+$, *en un total de 21 partes de histidina* en cualquier forma), o aproximadamente un 95,2%; el resto (100% menos 95,2%) está protonada, aproximadamente un 5%.

Nucleótidos tales como el ATP, así como muchos metabolitos de baja masa molecular, contienen grupos ionizables que pueden contribuir al poder tamponante del citoplasma. Algunos orgánulos altamente especializados y compartimentos extracelulares contienen elevadas concentraciones de compuestos que contribuyen a la capacidad tamponante: los ácidos orgánicos tamponan las vacuolas de las células vegetales; los tampones de amoníaco la orina.

Dos tampones biológicos especialmente importantes son los sistemas del fosfato y del bicarbonato. El sistema tampón del fosfato, que actúa en el citoplasma de todas las células, consiste en $H_2PO_4^-$ como dador de protones y HPO_4^{2-} como aceptor de protones:

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

El sistema tampón del fosfato presenta su efectividad máxima a un pH próximo a su pK_a de 6,86 (Figs. 2-16, 2-18), y tiende pues a resistir los cambios de pH en el intervalo entre 5,9 y 7,9. Es, por tanto, un tampón efectivo en los fluidos biológicos; en los mamíferos, por ejemplo, los fluidos extracelulares y la mayoría de compartimientos citoplasmáticos tienen un pH en el intervalo de 6,9 a 7,4.

EJEMPLO PRÁCTICO 2-6 Tampones fosfato

(a) ¿Cuál es el pH de una mezcla de 0,042 M de NaH_2PO_4 y 0,058 M de Na_2HPO_4?

Solución: Utilizamos la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que expresaremos como:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]}$$

En este caso, el ácido (la especie que libera un protón) es $H_2PO_4^-$, y la base conjugada (la especie que ha perdido un protón) es HPO_4^{2-}. Sustituyendo con las concentraciones dadas de ácido y base conjugada y con el valor del pK_a (6,86),

$$pH = 6{,}86 + \log \frac{0{,}058}{0{,}042} = 6{,}86 + 0{,}14 = 7{,}0$$

Podemos comprobar de modo cualitativo si esta respuesta es correcta. Si hay una mayor cantidad de base conjugada presente que de ácido, la titulación del

ácido está por encima del 50% y el pH está por encima del pK_a (6,86), punto en el cual el ácido está titulado al 50%.

(b) Si se añade 1,0 mL de NaOH 10,0 M a un litro del tampón preparado en (a), ¿cuánto variará el pH?

Solución: Un litro de tampón contiene 0,042 moles de NaH_2PO_4. La adición de 1,0 mL de NaOH 10,0 M (0,010 moles) titularía una cantidad equivalente (0,010 moles) de NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4, resultando en unas cantidades finales de 0,032 moles de NaH_2PO_4 y de 0,068 moles de Na_2HPO_4. El nuevo pH es:

$$pH = pK_a + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$= 6,86 + \log \frac{0,068}{0,032} = 6,86 + 0,33 = 7,2$$

(c) Si se añade 1,0 mL de NaOH 10,0 N a un litro de agua pura pH 7,0 ¿cuál será el pH final? Compárelo con la respuesta obtenida en (b).

Solución: El NaOH se disocia completamente en Na^+ y OH^-, dando $[OH^-] = 0,010$ mol/L $= 1,0 \times 10^{-2}$ M. El pOH es el logaritmo negativo de $[OH^-]$, de modo que pOH = 2,0. Dado que en todas las disoluciones, pH + pOH = 14, el pH de la disolución es 12.

Por tanto, una cantidad de NaOH que incrementa el pH del agua desde 7 a 12, incrementa el pH de una disolución tamponada, como la de (b), tan sólo desde 7,0 a 7,2. Esta es el poder del tamponamiento!

Copy-Station

El plasma sanguíneo está tamponado en parte por el sistema del bicarbonato que consiste en ácido carbónico (H_2CO_3) como dador de protones y el bicarbonato (HCO_3^-) como aceptor de protones (K_1 representa la primera de varias constantes de equilibrio en el sistema tampón del bicarbonato):

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Este sistema tampón es más complejo que otros pares ácido-base conjugados, ya que uno de sus componentes, el ácido carbónico (H_2CO_3) se forma a partir de dióxido de carbono disuelto (d) y agua, según la reacción reversible:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)][H_2O]}$$

El dióxido de carbono es un gas en condiciones normales, y el CO_2 en disolución acuosa se encuentra en equilibrio con el CO_2 de la fase gaseosa (g):

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$

$$K_3 = \frac{[CO_2(d)]}{[CO_2(g)]}$$

El pH de un sistema tampón de bicarbonato depende de la concentración de H_2CO_3 y de HCO_3^-, dador y aceptor de protones respectivamente. A su vez, la concentración de H_2CO_3 depende de la concentración de CO_2 disuelto, que a su vez depende de la concentración del CO_2 en la fase gaseosa, denominada **presión parcial** de CO_2 y representada por pCO_2. Así, el pH de un tampón bicarbonato expuesto a una fase gaseosa viene determinado en último término por la concentración de HCO_3^- en la fase acuosa y la pCO_2 en la fase gaseosa.

El sistema tampón del bicarbonato es un tampón fisiológico eficiente cerca de pH 7,4 ya que el H_2CO_3 del plasma sanguíneo está en equilibrio con una gran capacidad de reserva de CO_2(g) en el espacio aéreo de los pulmones. Como se ha dicho antes, este sistema tampón implica tres equilibrios reversibles, en este caso entre el CO_2 gaseoso en los pulmones y el bicarbonato (HCO_3^-) en el plasma sanguíneo **(Fig. 2-21)**.

La sangre puede captar H^+, por ejemplo a partir del ácido láctico producido en el tejido muscular durante un ejercicio vigoroso. De manera alternativa puede perder H^+, como sucede en la protonación del NH_3 producida durante el catabolismo de proteínas. Cuando se añade H^+ a la sangre a medida que ésta pasa por los tejidos, la reacción 1 de la Figura 2-21 se desplaza hacia un nuevo equilibrio en el que aumenta $[H_2CO_3]$. Esto implica a su vez el aumento de $[CO_2(d)]$ en la sangre (reacción 2) y así aumenta la presión de CO_2(g) en el espacio aéreo de los pulmones (reacción 3); el CO_2 sobrante se exhala. De manera inversa, cuando la sangre pierde H^+ tienen lugar los procesos opuestos: se disocia más H_2CO_3 en H^+ y HCO_3^- haciendo que se disuelva más CO_2(g) de los pulmones en el plasma sanguíneo. La velocidad de la respiración, esto es, la velocidad de inhalación y exhalación, puede ajustar estos equilibrios rápidamente y mantener casi constante el pH de la sangre. El ritmo de la respiración se controla en el tallo encefálico, donde la detección de un aumento en la pCO_2 o un descenso en el pH de la sangre induce una respiración más profunda y frecuente.

La hiperventilación, es decir la respiración acelerada producida a veces por el estrés o la ansiedad, inclina el equilibrio normal entre O_2 inspirado y CO_2 expirado a favor de un exceso de CO_2 expirado, aumentando el pH de la sangre a valores de 7,45 o más altos. Esta alcalosis puede producir mareos, dolores de cabeza, debilidad o

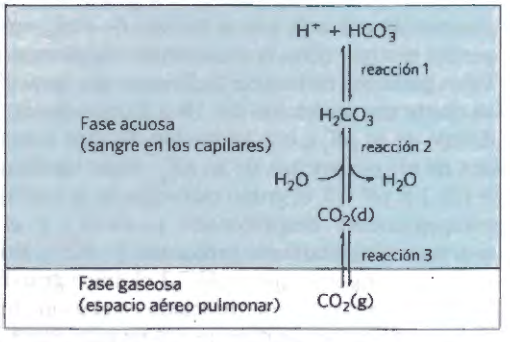


FIGURA 2-21 Sistema tampón del bicarbonato. El CO_2 del espacio aéreo de los pulmones está en equilibrio con el tampón bicarbonato en el plasma sanguíneo que pasa a través de los capilares pulmonares. Dado que la concentración de CO_2 disuelto se ajusta rápidamente mediante cambios en la velocidad de respiración, el sistema tampón del bicarbonato de la sangre está en un cuasi-equilibrio con una gran reserva potencial de CO_2.

desmayos. Un remedio casero contra la alcalosis moderada consiste en respirar brevemente dentro de una bolsa de papel. El aire de la bolsa se enriquece en CO_2 y la inhalación de este aire aumenta la concentración de CO_2 en sangre, lo que reduce su pH.

Al pH normal del plasma sanguíneo (7,4) hay poco H_2CO_3 presente en comparación con HCO_3^-, y la adición de una pequeña cantidad de base (NH_3 u OH^-) titularía todo el H_2CO_3, anulando la capacidad de tamponamiento. El importante papel del H_2CO_3 (pK_a = 3,57 a 37 °C) en el tamponamiento del plasma sanguíneo (~7,4) parece no estar de acuerdo con la anterior afirmación de que un tampón es más efectivo en el margen de 1 unidad de pH por debajo y por encima de su pK_a. La explicación de esta paradoja estriba en la gran reserva de CO_2(d) en la sangre. Su equilibrio rápido con H_2CO_3 da lugar a la formación de H_2CO_3 adicional:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

En medicina clínica resulta útil disponer de una expresión simple para el pH sanguíneo en base al CO_2 disuelto, que se controla de manera rutinaria conjuntamente con otros gases de la sangre. Podemos definir una constante, K_h, que es la constante de equilibrio de la hidratación del CO_2 para formar H_2CO_3:

$$K_h = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)]}$$

(La concentración de agua es tan elevada (55,5 M) que la disolución de CO_2 no cambia apreciablemente la $[H_2O]$, por lo que la $[H_2O]$ se incorpora como parte de la constante K_h.) A continuación, con el fin de tener en cuenta la reserva de CO_2(d), podemos expresar $[H_2CO_3]$ como $K_h[CO_2(d)]$, y sustituir esta expresión por $[H_2CO_3]$ en la ecuación de la disociación ácida de H_2CO_3:

$$K_a = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_h[CO_2(d)]}$$

Ahora, la constante de equilibrio global para la disociación de H_2CO_3 puede expresarse en estos términos:

$$K_hK_a = K_{combinada} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2(d)]}$$

Podemos calcular el valor de la nueva constante, $K_{combinado}$, y el correspondiente pK aparente, o $pK_{combinado}$, a partir de los valores determinados experimentalmente para K_h ($3,0 \times 10^{-3}$ M) y K_a ($2,7 \times 10^{-4}$ M) a 37 °C:

$$K_{combinada} = (3,0 \times 10^{-3}\ M)(2,7 \times 10^{-4}\ M)$$
$$= 8,1 \times 10^{-7}\ M^2$$
$$pK_{combinado} = 6,1$$

En medicina clínica es normal referirse a CO_2(d) como el ácido conjugado y usar su pK_a aparente (o combinado) de 6,1 para simplificar el cálculo del pH a partir de la $[CO_2(d)]$. La concentración de CO_2 disuelto es una función de la pCO_2, que en los pulmones es de aproximadamente 4,8 kilopascales (kPa), lo que corresponde a una $[H_2CO_3]$ ~ 1,2 mM. La $[HCO_3^-]$ del plasma es normalmente 24 mM, con lo que $[HCO_3^-]/[H_2CO_3]$ es aproximadamente igual a 20 y el pH de la sangre es $6,1 + \log 20 \sim 7,4$. ■

La diabetes no tratada produce acidosis que puede ser mortal

El plasma sanguíneo humano tiene normalmente un pH entre 7,35 y 7,4, y muchos de los enzimas que actúan en la sangre han evolucionado para tener su actividad máxima en esta zona de pH. Los enzimas tienen, normalmente, un máximo de actividad catalítica a un pH característico denominado **pH óptimo (Fig. 2-22)**. Su actividad catalítica desciende a ambos lados del pH óptimo, a menudo de forma abrupta. Así, un pequeño cambio en el pH puede provocar una gran diferencia en la velocidad de alguna reacción enzimática crucial. El control biológico del pH de las células y fluidos corporales es, por consiguiente, de importancia central en todos los aspectos del metabolismo y de las actividades celulares, y cambios en el pH de la sangre tienen marcadas consecuencias fisiológicas, como podemos deducir de los alarmantes experimentos descritos en el Recuadro 2-1.

En individuos con diabetes mellitus no tratada, la falta de insulina o la insensibilidad a su presencia (que depende del tipo de diabetes), impide la captación de glucosa desde la sangre a los tejidos y obliga al uso por parte de éstos de los ácidos grasos almacenados como fuente primaria de energía. Por razones que describiremos con detalle más adelante (véase la Fig. 23-31), esta dependencia de los ácidos grasos da como resultado la acumulación de grandes concentraciones de dos ácidos carboxílicos, el ácido β-hidroxibutírico y el ácido acetoacético (un nivel plasmático combinado de 90 mg/100 mL en comparación con <3 mg/100 mL en individuos control (sanos) y una excreción urinaria de 5 g/24 h, comparada con <125 mg/24 h en los controles). La disociación de estos ácidos hace descender el pH sanguíneo a menos de 7,35, causando acidosis. La acidosis grave produce dolor de cabeza, somnolencia, náuseas, vómitos y diarrea, seguidos de aletargamiento, coma y convulsiones, presumiblemente a consecuencia de que algunos enzimas no funcionan óptimamente a este pH

Copyrighted Material

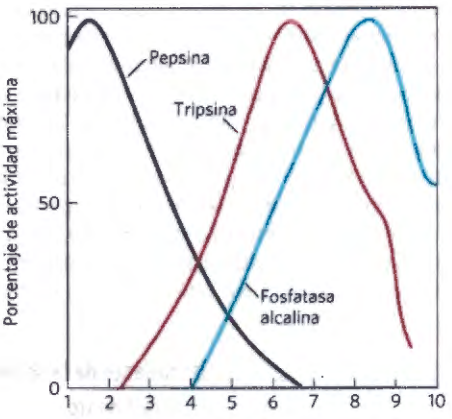


FIGURA 2-22 pH óptimos de algunos enzimas. La pepsina es un enzima digestivo secretado en el jugo gástrico, el cual tiene un pH de ~1,5 que permite una acción óptima de la pepsina. La tripsina, un enzima digestivo que actúa en el intestino delgado, tiene un pH óptimo que coincide con el pH neutro de la luz del intestino delgado. La fosfatasa alcalina del tejido óseo es un enzima hidrolítico que se cree que participa en la mineralización del hueso.

RECUADRO 2-1 MEDICINA Sobre cómo ser su propio conejillo de Indias (no lo intente en casa !)

"Quise averiguar qué le ocurría a un hombre cuando se convertía en más ácido o más alcalino.... Desde luego, podría haber intentado los experimentos en primer lugar con un conejo, puesto que ya se había hecho algún trabajo en esta línea; pero uno no puede estar nunca muy seguro de cómo se siente un conejo. De hecho, hay conejos que no quieren cooperar.

–J.B.S. Haldane, *Possible Worlds*
Harper and Brothers, 1928

Hace un siglo, el fisiólogo y genetista J.B.S. Haldane y su colega H.W. Davies decidieron experimentar en ellos mismos para estudiar de qué manera se controla el pH de la sangre. Se alcalinizaron hiperventilando e ingiriendo bicarbonato sódico, lo que les dejó jadeantes y con intensos dolores de cabeza. Intentaron acidificarse bebiendo ácido clorhídrico, pero calcularon que haría falta tomar casi siete litros de HCl diluido para lograr el efecto deseado, mientras que menos de medio litro era suficiente para irritarles la garganta. Finalmente, a Haldane se le ocurrió que si ingería cloruro amónico, parte de él se disociaría en su cuerpo liberando ácido clorhídrico y amoníaco. El amoníaco se convertiría en urea, una sustancia inocua, en el hígado. El ácido clorhídrico se combinaría con el bicarbonato sódico presente en todos los tejidos, produciendo cloruro sódico y dióxido de carbono. En este experimento, el déficit respiratorio resultante recordaba lo observado en la acidosis diabética y en los estados terminales de la enfermedad renal.

Mientras tanto, Ernst Freudenberg y Paul György, pediatras en Heildeberg, estaban estudiando la tetania muscular –la contracción muscular en manos, brazos, pies y laringe– en niños pequeños. Sabían que en ocasiones se observaba tetania muscular en pacientes que habían perdido grandes cantidades de ácido clorhídrico a causa de vómitos constantes y llegaron a la conclusión de que, si la alcalinización de los tejidos producía tetania muscular, era de esperar que la acidificación la curase. En el momento en que leyeron el artículo de Haldane sobre los efectos del cloruro amónico empezaron a administrarlo a los niños, y quedaron encantados al comprobar que los síntomas desaparecían en cuestión de horas. El tratamiento no eliminaba la causa primaria de la tetania muscular, pero permitía que pacientes y médicos dispusieran de más tiempo para el tratamiento.

COPY-STATION

más bajo. Cuando a un paciente se le detectan niveles elevados de glucosa en sangre, pH plasmático bajo y niveles elevados de ácido β-hidroxibutírico y ácido acetoacético en sangre y orina, el diagnóstico más probable es diabetes mellitus.

Otros estados pueden producir también acidosis. El ayuno y la inanición fuerzan el uso de los ácidos grasos almacenados como fuente de energía, con las mismas consecuencias que la diabetes. Ejercicios muy intensos, tales como los esprints de atletas o ciclistas, producen una acumulación temporal de ácido láctico en la sangre. El fallo renal disminuye la capacidad de regular los niveles de bicarbonato. Las enfermedades pulmonares (como el enfisema, la pulmonía o el asma) reducen la capacidad de eliminar el CO_2 producido durante la oxidación de nutrientes en los tejidos, con la consiguiente acumulación de H_2CO_3. La acidosis se trata atacando las causas subyacentes: administrando insulina a personas afectadas de diabetes, y esteroides o antibióticos a personas con enfermedades pulmonares. La acidosis grave puede revertirse administrando una disolución de bicarbonato por vía intravenosa. ■

EJEMPLO PRÁCTICO 2-7 Tratamiento de la acidosis con bicarbonato

¿Por qué aumenta el pH del plasma sanguíneo con la administración intravenosa de una disolución de bicarbonato?

Solución: La relación de concentraciones de HCO_3^- y de $CO_2(d)$ determina el pH del tampón bicarbonato según la ecuación:

$$pH = 6.1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Si la $[HCO_3^-]$ aumenta sin variación en la pCO_2, el pH aumentará.

RESUMEN 2.3 Tamponamiento contra cambios de pH en los sistemas biológicos

- Una mezcla de un ácido (o base) débil y su sal resiste los cambios de pH producidos por la adición de H^+ u OH^-. Esta mezcla actúa como un tampón.
- El pH de una disolución de ácido débil (o base débil) y su sal viene dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{ecuación}: pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

- En las células y los tejidos, los sistemas tampón de fosfato y bicarbonato mantienen los fluidos intracelulares y extracelulares en su pH óptimo (fisiológico), que es normalmente cercano a 7. Los enzimas suelen actuar de manera óptima a este pH.
- Los estados patológicos que hacen descender el pH de la sangre, causando acidosis, o que hacen que aumente, causando alcalosis, pueden poner en peligro la vida de las personas.

2.4 El agua como reactivo

El agua no es tan sólo el disolvente en el que tienen lugar las reacciones químicas de las células vivas; muy a menudo participa directamente en estas reacciones. La formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico constituye un ejemplo de una **reacción de condensación** en la que se eliminan los elementos del agua **(Fig. 2-22)**. La reacción inversa a ésta, rotura acompañada de la adición de los elementos del agua, es una **reacción de hidrólisis**. Las reacciones de hidrólisis son también responsables de la despolimerización enzimática de proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos. Las reacciones de hidrólisis, catalizadas por enzimas denominados **hidrolasas** son casi siempre exergónicas; al producir dos moléculas a partir de una conducen a un incremento en la entropía del sistema. La formación de polímeros celulares a partir de sus subunidades por simple inversión de la hidrólisis (es decir, mediante reacciones de condensación) sería endergónica, por lo que no tiene lugar. Como veremos, las células salvan este obstáculo termodinámico mediante el acoplamiento de reacciones de condensación endergónicas con procesos exergónicos, tales como la rotura del enlace anhídrido del ATP.

Al leer esto usted está (¡eso esperamos!) consumiendo oxígeno. El agua y el dióxido de carbono son los productos finales de la oxidación de combustibles tales como la glucosa. La reacción global de este proceso se puede resumir como

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

COPY-STATION

El "agua metabólica" así formada por la oxidación de los alimentos y las grasas almacenadas es de hecho suficiente para permitir que algunos animales que viven en hábitats muy secos (jerbos, ratas canguro, camellos) sobrevivan sin beber agua durante largos períodos de tiempo.

El CO_2 producido por la oxidación de glucosa se convierte en los eritrocitos en la forma más soluble HCO_3^-, mediante una reacción catalizada por el enzima carbónico anhidrasa:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

En esta reacción, el agua no es tan sólo un sustrato sino que actúa en un proceso de transferencia de protones formando una red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno a través de las que se produce un salto de protones (Fig. 2-14).

Las plantas y algas verdes utilizan la energía de la luz solar para romper el agua en el proceso de la fotosíntesis

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 2AH_2$$

En esta reacción, A es una especie aceptora de electrones que varía según el tipo de organismo fotosintético y el agua actúa de dador de electrones en una secuencia de oxidación-reducción (véase la Fig. 19-59) que es fundamental para todas las formas de vida.

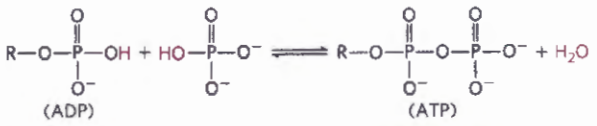


FIGURA 2-23 Participación del agua en reacciones biológicas. El ATP es un fosfoanhídrido formado por una reacción de condensación (pérdida de los elementos de una molécula de agua) entre ADP y fosfato. R representa adenosina monofosfato (AMP). Esta reacción de condensación requiere energía. La hidrólisis (adición de los elementos de una molécula de agua) del ATP para formar ADP y fosfato libera una cantidad equivalente de energía. Estas reacciones de condensación y de hidrólisis del ATP son tan solo un ejemplo del papel del agua como reactivo en procesos biológicos.

RESUMEN 2.4 El agua como reactivo

■ El agua es a la vez el disolvente en el que tienen lugar las reacciones metabólicas y un reactivo que interviene en muchos procesos bioquímicos, entre los que se incluyen las reacciones de hidrólisis, de condensación y de oxidación-reducción.

2.5 La adecuación del ambiente acuoso a los organismos vivos

Los organismos se han adaptado de manera efectiva a su ambiente acuoso y han desarrollado medios para aprovechar las inusuales propiedades del agua. El alto calor específico del agua (el calor necesario para elevar en 1°C la temperatura de 1 g de agua) es útil para las células y organismos porque permite que el agua actúe como un "tampón térmico", permitiendo que la temperatura de un organismo permanezca relativamente constante cuando varía la temperatura del entorno o se genera calor como subproducto del metabolismo. Además, algunos vertebrados aprovechan el elevado calor de vaporización del agua (Tabla 2-1) utilizando (es decir, perdiendo) exceso de calor corporal para evaporar el sudor. El alto grado de cohesión interna del agua líquida, debido a los enlaces de hidrógeno, es aprovechado por las plantas como medio para transportar nutrientes disueltos desde las raíces a las hojas durante el proceso de la transpiración. Incluso la densidad del hielo, menor que la del agua líquida, tiene consecuencias biológicas importantes en los ciclos vitales de los organismos acuáticos. Los estanques se congelan desde arriba hacia abajo y la capa de hielo superior aísla el agua de debajo del aire frígido, impidiendo que el estanque (y los organismo que hay en él) se congelen. De importancia capital para todos los organismos vivos es el hecho de que muchas propiedades físicas y biológicas de las macromoléculas celulares, especialmente las proteínas y los ácidos nucleicos, provienen de sus interacciones con moléculas de agua del medio circundante. La influencia del agua en el transcurso de la evolución biológica ha sido profunda y determinante. Es improbable que otras formas de vida que pudieran haber aparecido en algún otro lugar del universo se parezcan a las de la tierra, a menos que su planeta de origen fuera también rico en agua líquida.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

enlace de hidrógeno 48
energía de enlace 48
hidrofílico 50
hidrofóbico 50
anfipático 52
micela 52
efecto hidrofóbico 52
interacciones hidrofóbicas 53
interacciones de van der Waals 53
osmolaridad 56
ósmosis 56
isotónico 56
hipertónico 56
hipotónico 56
constante de equilibrio (K_{eq}) 58
producto iónico del agua (K_w) 59
pH 60
acidosis 61
alcalosis 61
par ácido-base conjugado 61
constante de disociación ácida (K_a) 62
pK_a 62
curva de titulación 62
tampón 64
región de tamponamiento 64
ecuación de Henderson-Hasselbalch 64
condensación 69
hidrólisis 69

Problemas

1. Efecto del entorno local en la fuerza del enlace iónico. Si el sitio de unión del ATP se halla enterrado en el interior de un enzima, en un entorno hidrofóbico, ¿la interacción iónica entre el enzima y su sustrato es más fuerte o más débil que la misma interacción si ésta se produjera en la superficie del enzima expuesta al agua?

2. Ventajas biológicas de las interacciones débiles Las interacciones entre biomoléculas se estabilizan a menudo mediante interacciones débiles como enlaces de hidrógeno. ¿Cuál es la razón de que este fenómeno sea una ventaja para el organismo?

3. Solubilidad del etanol en agua. Explique por qué el etanol (CH_3CH_2OH) es más soluble en agua que el etano (CH_3CH_3).

4. Cálculo del pH a partir de la concentración de ion hidrógeno ¿Cuál es el pH de una disolución que tiene una concentración de H^+ de (a) $1{,}75 \times 10^{-5}$ mol/L; (b) $6{,}50 \times 10^{-10}$ mol/L; (c) $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol/L; (d) $1{,}50 \times 10^{-5}$ mol/L?

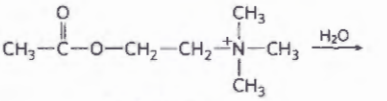
5. Cálculo de la concentración de ion hidrógeno a partir del pH ¿Cuál es la concentración de H^+ de una disolución de pH (a) 3,82; (b) 6,52; (c) 11,11?

6. Acidez del HCl gástrico. En el laboratorio de un hospital se tituló hasta neutralidad con NaOH 0,1 M una muestra de 10,0 mL de jugo gástrico obtenido varias horas después de una comida; se necesitaron 7,2 mL de NaOH. El estómago del paciente no contenía comida ni bebida ingerida por lo que se puede suponer que no había tampones presentes. ¿Cuál era el pH del jugo gástrico?

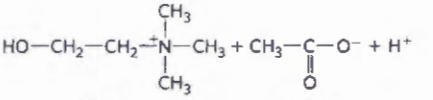
7. Cálculo del pH de un ácido o base fuertes (a) Escriba la reacción de disociación ácida del ácido clorhídrico. (b) Calcule el pH de una disolución de $5{,}0 \times 10^{-4}$ M HCl. (c) Escriba la reacción de disociación ácida del hidróxido de sodio. (d) Calcule el pH de una disolución de $7{,}0 \times 10^{-6}$ M NaOH.

8. Cálculo del pH a partir de la concentración de ácido fuerte Calcule el pH de una disolución preparada por dilución de 3,0 mL de HCl 2,5 M hasta un volumen final de 100 mL con H_2O.

9. Medida de los niveles de acetilcolina por cambios del pH La concentración de la acetilcolina (un neurotransmisor) en una muestra se puede determinar a partir de los cambios de pH que acompañan a su hidrólisis. Cuando se incuba la muestra con el enzima acetilcolinesterasa, la acetilcolina se convierte cuantitativamente en colina y ácido acético, el cual se disocia produciendo acetato y un ion hidrógeno:



Acetilcolina



Colina Acetato

En un análisis típico, una muestra de 15 mL de una solución acuosa que contenía una cantidad desconocida de acetilcolina tenía un pH de 7,65. Cuando se incubó con acetilcolinesterasa, el pH de la solución descendió hasta 6,87. Suponiendo que no había tampón en la mezcla de ensayo, determine el número de moles de acetilcolina en los 15 mL de la muestra.

10. Significado físico del pK_a ¿Cuál de las disoluciones acuosas siguientes tiene el pH más bajo: HCl 0,1 M; ácido acético 0,1 M (pK_a = 4,80); ácido fórmico 0,1 M (pK_a = 3,75)?

11. Significado de K_a y pK_a (a) Un ácido fuerte, ¿tiene mayor o menor tendencia a perder su protón que un ácido débil? (b) ¿Es la K_a del ácido fuerte mayor o menor que la del ácido débil? (c) ¿Tiene el ácido fuerte un pK_a mayor o menor que el del ácido débil?

Copy-Station

12. Vinagre artificial Una forma de preparar vinagre (*no* la más recomendable) consiste en hacer una disolución de ácido acético, único componente ácido del vinagre, al pH adecuado (véase la Fig. 2-15) y añadir agentes saborizantes adecuados. El ácido acético (M_r 60) es líquido a 25 °C con una densidad de 1,049 g/mL. Calcule el volumen que se debe añadir a agua destilada para hacer 1 L de vinagre artificial (véase la Fig. 2-16).

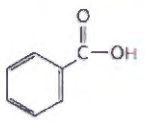
13. Identificación de la base conjugada ¿Cuál es la base conjugada en cada uno de los siguientes pares de compuestos?

(a) RCOOH, $RCOO^-$
(b) RNH_2, RNH_3^+
(c) $H_2PO_4^-$, H_3PO_4
(d) H_2CO_3, HCO_3^-

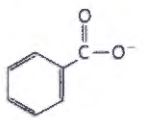
14. Cálculo del pH de nna mezcla de ácido débil y su base conjugada Calcule el pH de una disolución diluida que contiene una relación molar de acetato potásico: ácido acético (pK_a = 4,76) de (a) 2:1; (b) 1:3; (c) 5:1; (d) 1.1; (e) 1:10.

15. Efecto del pH sobre la solubilidad La naturaleza fuertemente polar y formadora de enlaces de hidrógeno del agua hace que sea un disolvente excelente para las especies iónicas (cargadas). En cambio, las moléculas orgánicas apolares no ionizadas, tales como el benceno, son relativamente insolubles en agua. En principio, la solubilidad en agua de cualquier ácido o bases orgánicos se puede incrementar mediante la conversión de las moléculas en especie cargadas. Por ejemplo, la solubilidad del ácido benzoico en agua es baja. La adición de bicarbonato sódico a una mezcla de agua y ácido benzoico au-

menta el pH y desprotona el ácido benzoico formando el ion benzoato, que es bastante soluble en agua.



Acido benzoico
$pK_a \approx 5$



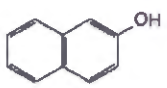
Ion benzoato

¿Son los siguientes compuestos más solubles en una disolución acuosa de NaOH 0,1 M o de HCl 0,1 M? (Los protones disociables se señalan en rojo.)



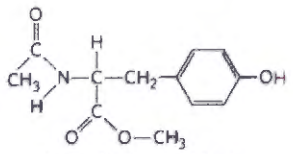
Ion piridina
$pK_a \approx 5$

(a)



β-Naftol
$pK_a \approx 10$

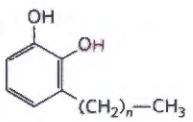
(b)



N-acetiltirosina metil éster
$pK_a \approx 10$

(c)

16. Tratamiento de la urticaria por hiedra venenosa Los componentes de la hiedra y el roble venenosos que producen la urticaria característica son catecoles sustituidos con grupos alquilo de cadena larga.

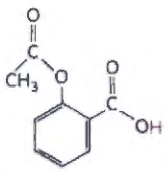


$pK_a \approx 8$

Si hubiera estado expuesto a la acción de la hiedra venenosa, ¿cuál de los tratamientos siguientes aplicaría al área afectada? Justifique su elección.

(a) Lavar el área con agua fría.
(b) Lavar el área con vinagre diluido o zumo de limón.
(c) Lavar el área con agua y jabón.
(d) Lavar el área con jabón, agua y bicarbonato sódico.

17. pH y absorción de fármacos La aspirina es un ácido débil con un pK_a de 3,5 (el H ionizable se muestra en rojo):



Se absorbe en la sangre a través de las células que cubren el estómago y el intestino delgado. La absorción implica el paso a través de la membrana plasmática, y la velocidad del proceso viene determinada por la polaridad de la molécula: las moléculas cargadas y muy polares pasan lentamente, mientras que las que son hidrofóbicas y neutras pasan rápidamente. El pH del contenido del estómago es alrededor de 1,5 y el pH del contenido del intestino delgado es alrededor de 6. ¿Se absorbe más aspirina hacia el torrente sanguíneo en el estómago o en el intestino delgado? Justifique claramente su elección.

18. Cálculo del pH a partir de concentraciones molares ¿Cuál es el pH de una disolución que contiene 0,12 mol/L de NH_4Cl y 0,03 mol/L de NaOH (el pK_a de NH_4^+/NH_3 es de 9,25)?

19. Cálculo del pH después de la titulación de un ácido débil. Un compuesto tiene un pK_a de 7,4. Se añaden 30 mL de ácido clorhídrico 1,0 M a 100 mL de una disolución 1,0 M del compuesto a pH 8,0. ¿Cuál es el pH de la disolución resultante?

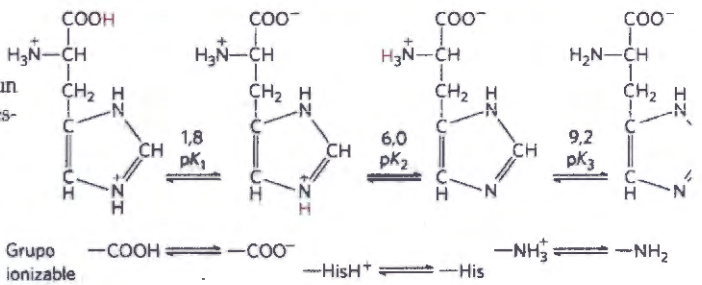
20. Propiedades de un tampón El aminoácido glicina se utiliza a menudo como principal ingrediente de un tampón en experimentos bioquímicos. El grupo amino de la glicina que tiene un pK_a de 9,6, puede existir en la forma protonada ($-NH_3^+$) o como base libre ($-NH_2$) debido al equilibrio reversible

$$R{-}NH_3^+ \rightleftharpoons R{-}NH_2 + H^+$$

(a) ¿En qué intervalo de pH puede utilizarse la glicina como tampón eficiente gracias a su grupo amino?
(b) En una disolución 0,1 M de glicina a pH 9,0, ¿qué fracción de la glicina tiene su grupo amino en la forma $-NH_3^+$?
(c) ¿Qué cantidad de KOH 5 M debe añadirse a 1,0 L de glicina 0,1 M a pH 9,0 para llevar su pH exactamente a 10,0?
(d) Cuando el 99% de la glicina está en su forma $-NH_3^+$, ¿cuál es la relación numérica entre el pH de la solución y el pK_a del grupo amino?

21. Cálculo del pK_a de un grupo ionizable mediante titulación Los valores de pK_a de un compuesto con dos grupos ionizables son $pK_1 = 4{,}10$ y pK_2 entre 7 y 10. Un bioquímico tiene 10 mL de una disolución 1,0 M de este compuesto a pH 8,00. Añade 10,0 mL de HCl 1,00 M y el pH cambia a 3,2. Cuál es el pK_2?

22. Cálculo del pH de una disolución de un ácido poliprótico. La histidina tiene grupos ionizables con valores de pK_a de 1,8, 6,0 y 9,2 tal como se muestra a continuación (His= grupo imidazol). Un bioquímico prepara 100 mL de una disolución 0,100 M de histidina a pH 5,40. Después añade 40 mL de HCl 0,10 M. ¿Cuál es el pH de la disolución resultante?



23. Cálculo del pH original a partir del pH final después de una titulación. Un bioquímico tiene 100 mL de una disolución 0,10 M de un ácido débil con un pK_a de 6,3. Añade 6,0 mL de HCl 0,1 M y el pH cambia a 5,7. ¿Cuál era el pH de la disolución original?

24. Preparación de un tampón fosfato ¿Qué relación molar de HPO_4^{2-} y $H_2PO_4^-$ produciría un pH de 7,0 en disolución? El ácido fosfórico (H_3PO_4), un ácido triprótico, tiene tres valores de pK_a: 2,14, 6,86 y 12,4. Sugerencia: solamente uno de los valores de pK_a tiene importancia en este caso.

25. Preparación de un tampón estándar para la calibración de un pHmetro El electrodo de vidrio utilizado en los pHmetros comerciales da una respuesta eléctrica proporcional a la concentración de ion hidrógeno. Para convertir estas respuestas en lecturas de pH, deben calibrarse los electrodos de vidrio frente a disoluciones estándar de concentración de H^+ conocida. Determine el peso en gramos de dihidrógeno fosfato sódico ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; masa 138) y de hidrógeno fosfato disódico (Na_2HPO_4; masa 142) necesarios para preparar 1 L de un tampón estándar a pH 7,00 con una concentración total de fosfato de 0,100 M (véase la Fig. 2-16). Consulte en el problema 22 los valores de pK_a del ácido fosfórico.

26. Cálculo de las relaciones molares de base conjugada y ácido débil a partir del pH Calcule la relación entre base conjugada y ácido a pH 5,0 de un ácido débil con un pK_a de 6,0.

27. Preparación de un tampón de concentración y pH conocidos Dadas dos disoluciones a 0,10 M de ácido acético ($pK_a = 4,76$) y acetato sódico, describa como prepararía 1,0 L de tampón acetato 0,10 M a pH 4,00.

28. Elección del ácido débil para un tampón ¿Cuál de los compuestos siguientes sería el mejor tampón a pH 5,0: ácido fórmico ($pK_a = 3,8$), ácido acético ($pK_a = 4,76$) o etilamina ($pK_a = 9,0$)? Justifique brevemente su respuesta.

29. Trabajando con tampones Un tampón contiene 0,010 moles de ácido láctico ($pK_a = 3,86$) y 0,050 moles de lactato sódico por litro. (a) Calcule el pH del tampón. (b) Calcule el cambio en el pH cuando se añaden 5 mL de HCl 0,5 M a 1 L del tampón. (c) ¿Qué cambio en el pH se esperaría si se añadiera la misma cantidad de HCl a 1 L de agua pura?

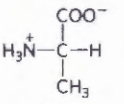
30. Uso de las concentraciones molares para calcular el pH ¿Cuál es el pH de una disolución que contiene 0,20 M de acetato sódico y 0,60 M de ácido acético ($pK_a = 4,76$)?

31. Preparación de un tampón acetato Calcule las concentraciones de ácido acético ($pK_a = 4,76$) y de acetato sódico necesarias para preparar una disolución tampón 0,2 M a pH 5,0.

32. pH de la secreción de defensa de un insecto Ha estado observando a un insecto que se defiende de sus enemigos secretando un líquido cáustico. El análisis del líquido muestra que contiene una concentración total de formiato y ácido fórmico ($pK_a = 1,8 \times 10^{-4}$) de 1,45 M; La concentración de ion formiato es de 0,015 M. ¿Cuál es el pH de la secreción?

33. Cálculo del pK_a Se cree que un compuesto X desconocido tiene un grupo carboxílico con un pK_a de 2,0 y otro grupo ionizable con un pK_a comprendido entre 5 y 8. Cuando se añaden 75 mL de NaOH 0,1 M a 100 mL de una disolución 0,1 M de X a pH 2,0, el pH aumenta hasta 6,72. Calcule el pK_a del segundo grupo ionizable de X.

34. Formas iónicas de la alanina La alanina es un ácido diprótico que puede experimentar dos reacciones de disociación (compruebe los valores de pK_a en la tabla 3-1). (a) Dada la estructura de la forma parcialmente protonada (o zwitterion; véase la Fig. 3-9) de la figura, dibuje las estructuras de las otras dos formas que predominan en disolución acuosa: la completamente protonada y la completamente desprotonada.



Alanina

De las tres formas posibles de la alanina, ¿Cuál estaría a mayor concentración en disoluciones con los siguientes valores de pH?: (b) 1,0; (c) 6,2; (d) 8,02; (e) 11,9. Explique sus respuestas en términos de pH relativo a los dos valores de pK_a.

35. Control del pH sanguíneo mediante el ritmo de respiración

(a) La presión parcial de CO_2 en los pulmones puede variar rápidamente con la velocidad y profundidad de la respiración. Por ejemplo, un remedio común para aliviar el hipo es incrementar la concentración de CO_2 en los pulmones. Esto se puede conseguir conteniendo la respiración, respirando escasamente y de forma lenta (hipoventilación) o respirando dentro de una bolsa de papel. En tales condiciones, la pCO_2 en el espacio de aire de los pulmones aumenta por encima de la normal. Explique cualitativamente el efecto de este proceder sobre el pH sanguíneo.

(b) Una práctica común de los corredores de distancias cortas es respirar rápida y profundamente (hiperventilación) durante aproximadamente medio minuto para eliminar el CO_2 de los pulmones justo antes de empezar la carrera. El pH de su sangre puede aumentar a 7,60. Explique por qué aumenta el pH de la sangre.

(c) Durante una carrera de corta distancia los músculos producen una gran cantidad de ácido láctico ($CH_3CH(OH)COOH$, $K_a = 1,38 \times 10^{-4}$) a partir de sus depósitos de glucosa. En vista de ello, ¿por qué puede ser útil una hiperventilación antes de un sprint?

36. Cálculo del pH de la sangre a partir de los niveles de CO_2 y bicarbonato Calcule el pH de una muestra de plasma sanguíneo con concentraciones totales de CO_2 y bicarbonato de 26,9 mM y 25,6 mM, respectivamente. Recuerde de la página 67 que el pK_a del ácido carbónico que interesa en este caso es 6,1.

37. Efecto de aguantar la respiración sobre el pH de la sangre El pH del líquido extracelular está tamponado mediante el sistema bicarbonato/ácido carbónico. Aguantar la respiración puede incrementar la concentración de $CO_2(g)$ en la sangre. ¿Qué efecto puede tener esto sobre el pH del líquido extracelular? Explíquelo mostrando la o las ecuaciones de equilibrio de interés para este sistema.

Problema de análisis de datos

38. Tensioactivos (surfactantes) "activables" Las moléculas hidrofóbicas no se disuelven bien en agua. Al ser ésta un disolvente muy común, ciertos procesos son muy difíciles: lavar platos con residuos muy grasientos, eliminar combustible derramado, mezclar bien las fases acuosa y aceitosa de un aliño de ensalada o llevar a cabo reacciones que implican la presencia de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos.

Los tensioactivos son una clase de compuestos anfipáticos que incluye a los jabones, detergentes y emulsificadores. Mediante el uso de tensioactivos es posible suspender compuestos hidrofóbicos en disolución acuosa formando micelas (véase la Fig. 2-7). Una micela tiene un núcleo hidrofóbico que con-

CopyStation

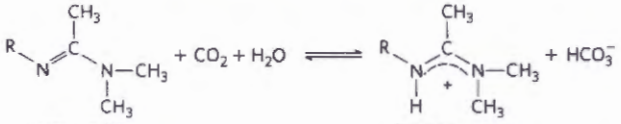
tiene el compuesto hidrofóbico y las "colas" hidrofóbicas del tensioactivo; las "cabezas" hidrofílicas del tensioactivo cubren la superficie de la micela. Se denomina emulsión a una suspensión de micelas. Cuanto más hidrofílico sea el grupo de la cabeza del tensioactivo, más poderoso será: es decir, mayor será su capacidad de emulsificación de material hidrofóbico.

Cuando se usa jabón para quitar la grasa de platos sucios, el jabón forma una emulsión con la grasa, que se elimina fácilmente con agua gracias a la interacción con la cabeza hidrofílica de las moléculas de jabón. De modo parecido se puede utilizar detergente para emulsificar combustible derramado y eliminarlo con agua. Y los emulsificadores de los aliños comerciales de ensaladas mantienen el aceite como suspensión homogénea en toda la mezcla acuosa.

En ciertas situaciones sería útil disponer de un tensioactivo "activable": una molécula que pudiera ser convertida de tensioactivo a no tensioactivo de manera reversible.

(a) Imagine que existe este supuesto tensioactivo "activable". ¿Cómo lo utilizaría para limpiar y después recuperar el combustible procedente de un vertido?

Liu y colaboradores describieron un tensioactivo activable prototípico en su artículo de 2006 "Tensioactivos activables". La activación se basa en la reacción siguiente:

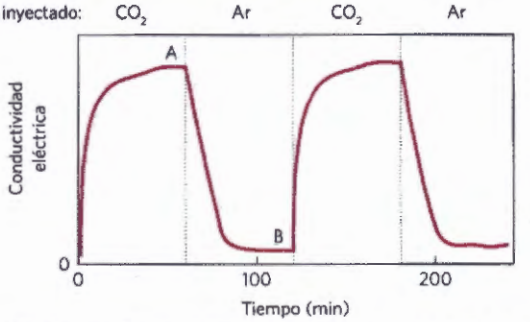


(b) Dado que el pK_a de un ion amidinio típico es de 12.4, ¿hacia qué dirección (hacia la derecha o hacia la izquierda) esperaría que se desplazara el equilibrio de la reacción anterior? (Compruebe los valores de pK_a en la Fig. 2-16.) Justifique su respuesta. Pista: recuerde la reacción $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3$.

Liu y colaboradores produjeron un tensioactivo activable para el que R = $C_{16}H_{33}$. En su artículo no dan ningún nombre a la molécula; para hacerlo corto la llamaremos s-surf.

(c) La forma amidinio de s-surf es un tensioactivo potente; la forma amidina no lo es. Explique esta observación.

Liu y colaboradores encontraron que podían cambiar de una forma de s-surf a la otra variando el gas que burbujeaban a través de una disolución de tensioactivo. Demostraron esta transición midiendo la conductividad eléctrica de la disolución de s-surf; las disoluciones acuosas de compuestos iónicos tienen mayor conductividad que las de compuestos no iónicos. Empezaron con una disolución de la forma amidina de s-surf en agua. Sus resultados se muestran a continuación; las líneas de puntos indican el cambio de un gas a otro.



(d) ¿En qué forma se encuentra la mayoría de s-surf en el punto A? ¿Y en el punto B?

(e) ¿Por qué aumenta la conductividad desde tiempo 0 hasta el punto A?

(f) ¿Por qué cae la conductividad entre el punto A y el punto B?

(g) Explique cómo emplearía s-surf para limpiar y recuperar el combustible de un vertido.

COPYRIGHTATION

Referencia

Y. Liu, P.G. Jessop, M. Cunningham, C.A. Eckert, and C.L. Liotta. 2006. Switchable surfactants. *Science* 313:958–960.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 3

Aminoácidos, péptidos y proteínas

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

3.1 Aminoácidos 75

3.2 Péptidos y proteínas 85

3.3 Trabajar con proteínas 88

3.4 Estructura de proteínas: estructura primaria 96

COPY-STATION

Las proteínas intervienen en prácticamente todos los procesos que tienen lugar en la célula y ejercen una diversidad casi inagotable de funciones. En la exploración de los mecanismos moleculares de un proceso biológico, el bioquímico debe estudiar, de manera casi inevitable, una o más proteínas. Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes y están presentes en todas las células y en todas las partes de la célula. Las proteínas también presentan una gran variedad; en una sola célula se pueden encontrar miles de proteínas diferentes. Siendo los árbitros de las funciones moleculares, las proteínas son los productos finales más importantes de las rutas de información que se discuten en la Parte III de este libro. Las proteínas son los instrumentos moleculares mediante los que se expresa la información genética.

La clave de la estructura de los miles de proteínas diferentes se encuentra en unas subunidades monoméricas relativamente simples. Las proteínas de todos los organismos, desde las bacterias más simples al ser humano, están construidas a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos. Puesto que cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral propia que determina sus propiedades químicas, se puede considerar a este grupo de 20 moléculas precursoras como el alfabeto en el que está escrito el lenguaje de la estructura proteica.

Para generar una proteína determinada se unen aminoácidos de forma covalente en secuencias lineales características. Lo que resulta más extraordinario es que las células puedan producir proteínas con propiedades y actividades muy diferentes uniendo los mismos 20 aminoácidos en multitud de combinaciones y secuencias diferentes. A partir de estos bloques estructurales los diferentes organismos pueden fabricar productos tan diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, fibras musculares, la proteína del cristalino del ojo, plumas, telas de araña, cuernos de rinoceronte, proteínas de la leche, antibióticos, venenos de hongos y una pléyade de otras sustancias con actividades biológicas distintas **(Fig. 3-1)**. Los enzimas son los productos proteicos más variados y especializados. Como catalizadores de prácticamente todas las reacciones celulares, los enzimas constituyen una de las claves para comprender la química de la vida y son un punto de referencia para cualquier curso de bioquímica.

La estructura y función de las proteínas constituye el tema de este capítulo y de los tres siguientes. Empezamos con una descripción de las propiedades químicas fundamentales de los aminoácidos, los péptidos y las proteínas. También consideraremos la manera en que un bioquímico trabaja con proteínas.

3.1 Aminoácidos

Las proteínas son polímeros de aminoácidos, en los que cada **residuo aminoácido** está unido al siguiente a través de un tipo específico de enlace covalente. (El término "residuo" refleja la pérdida de los elementos del agua cuando un aminoácido se une a otro.) Las proteínas se pueden degradar (hidrolizar) hasta sus aminoácidos constituyentes mediante diversos métodos, por lo que los estudios iniciales sobre las proteínas se centraron en los aminoácidos libres procedentes de las mismas. Veinte son los aminoácidos encontrados habitualmente en las proteínas. El primer aminoácido descubierto fue la asparagina en 1806. El último de los 20 que se encontró fue la treonina, que no fue identificada hasta 1938. Todos los aminoácidos tienen nombres comunes o triviales que, en algunos casos, provienen de la fuente de la cual se aislaron inicialmente. La asparagina se encontró por primera vez en el espárrago y el ácido glutámico se encontró en el gluten de trigo; la tirosina se aisló por primera vez del queso (así su nombre proviene del griego *tyros*, "queso");

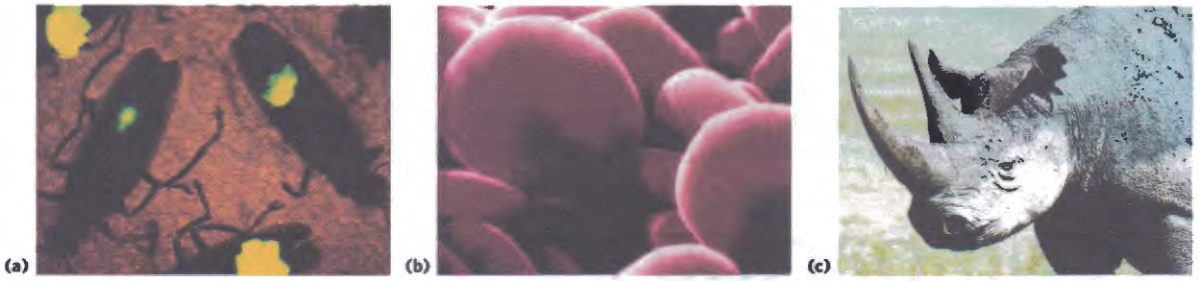


FIGURA 3-1 Algunas funciones de las proteínas. **(a)** La luz producida por las luciérnagas es el resultado de una reacción en que interviene la proteína luciferina y ATP, catalizada por el enzima luciferasa (véase el Recuadro 13-1). **(b)** Los eritrocitos contienen grandes cantidades de la proteína transportadora de oxígeno hemoglobina. **(c)** La proteína queratina, producida por todos los vertebrados, es el componente estructural principal del pelo, escamas, cuernos, lana, uñas y plumas. El rinoceronte negro salvaje se encuentra en vías de extinción debido a la creencia extendida en algunas partes del mundo de que el polvo derivado de su cuerno tiene propiedades afrodisíacas. En realidad, las propiedades químicas del polvo de cuerno de rinoceronte no son diferentes del de las pezuñas de bóvidos o de las uñas humanas. [Fuentes: (a) Jeff J. Daly/Alamy. (b) Bill Longcore/Science Source. (c) Mary Cooke/Animals Animals.]

y la glicina (del griego *glykos*, "dulce") se denominó de esta manera debido a su sabor dulce.

Los aminoácidos tienen características estructurales comunes

Los 20 aminoácidos estándar encontrados en las proteínas son α-aminoácidos. Todos tienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono (el carbono α) **(Fig. 3-2)**. Difieren entre ellos en sus cadenas laterales, o **grupos R**, que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica y que influyen en la solubilidad en agua de los aminoácidos. Además de estos 20 aminoácidos existen muchos más que son menos comunes. Algunos de ellos son residuos que han sido modificados después de la síntesis de la proteína; otros se hallan presentes en organismos vivos pero no como unidades constituyentes de las proteínas y dos más son casos especiales que se encuentran en tan solo unas pocas proteínas. A los aminoácidos estándar de las proteínas se les han asignado abreviaturas de tres letras y símbolos de una sola letra (Tabla 3-1) que se utilizan para indicar de manera abreviada la composición y secuencia de aminoácidos polimerizados en las proteínas.

›› Convención Clave: El código de tres letras es transparente: las abreviaturas consisten generalmente en las tres primeras letras del nombre del aminoácido. El código de una letra fue propuesto por Margaret Oakley Dayhoff, considerada por muchos como la fundadora del campo de la bioinformática. El código de una sola letra procede del intento de reducir el tamaño de los archivos de datos (en la era en que se usaban fichas agujereadas) utilizados para la descripción de las secuencias de aminoácidos. Se diseñó para ser memorizada fácilmente y la descripción de su origen puede ser

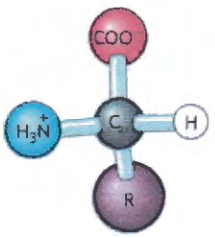


FIGURA 3-2 Estructura general de un aminoácido. Esta estructura es común a todos los α-aminoácidos, con una única excepción. (La excepción es la prolina, un aminoácido cíclico.) El grupo R o cadena lateral (púrpura) unido al carbono α (gris) es diferente para cada aminoácido.



Margaret Oakley Dayhoff, 1925–1983

útil al estudiante. La primera letra del nombre del aminoácido es única para seis de ellos (CHIMSV), por lo que se utiliza directamente como su símbolo. Para otros cinco aminoácidos (AGLPT), la primera letra no es única y se asigna al aminoácido más frecuente en proteínas (por ejemplo, la leucina es más frecuente que la lisina). En el caso de otros cuatro, la letra utilizada es fonéticamente sugestiva en idioma inglés (RFYW: aRginina, Fenilalanina, tYrosina, tWiptófano). El resto fueron de asignación más difícil. Cuatro de ellos (DNEQ) recibieron letras contenidas en sus nombres o sugeridas por ellos (aspárDico, asparagiNa, glutámEco, Q-tamina – por glutamina). Restaba la lisina. De las pocas letras no usadas del alfabeto se escogió la K, que es la más próxima a L. ‹‹

En todos los aminoácidos estándar excepto la glicina, el carbono α está unido a cuatro grupos diferentes: un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno (Fig. 3-2; en la glicina el grupo R es otro átomo de hidrógeno). El átomo de carbono α es, por tanto, un centro quiral. Debido al ordenamiento tetraédrico de los orbitales de enlace alrededor del átomo de carbono α, los cuatro grupos diferentes pueden ocupar dos ordenamientos diferentes en el espacio, por lo que los aminoácidos pueden aparecer en forma de dos estereoisómeros. Al ser imágenes especulares no superponibles entre sí **(Fig. 3-3)**, las dos formas constituyen un tipo de estereoisómeros denominados **enantiómeros** (véase la Fig. 1-20). Todas las moléculas con un centro quiral son también ópticamente activas, es decir, hacen girar el plano de la luz polarizada (véase el Recuadro 1-2).

›› Convención Clave: Se utilizan dos convenciones para identificar los carbonos de un aminoácido, una práctica que puede generar confusión. Los carbonos adicionales de un grupo R, se designan comúnmente β, γ, δ, ε, etc.,

COPY-STATION

TABLA 3-1 Propiedades y convenciones asociadas con los aminoácidos estándar presentes en las proteínas

Aminoácido	Abreviatura/ símbolo	M_r[a]	Valores de pK'_a pK_1 (—COOH)	pK_2 ($—NH_3^+$)	pK_R (R group)	pI	Índice hidropático[b]	Presencia en las proteínas (%)[c]
Grupos R apolares, alifáticos								
Glicina	Gly G	75	2,34	9,60		5,97	–0,4	7,2
Alanina	Ala A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro P	115	1,99	10,96		6,48	–1,6[d]	5,2
Valina	Val V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos								
Fenilalanina	Phe F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	–1,3	3,2
Triptófano	Trp W	204	2,38	9,39		5,89	–0,9	1,4
Grupos R polares sin carga								
Serina	Ser S	105	2,21	9,15		5,68	–0,8	6,8
Treonina	Thr T	119	2,11	9,62		5,87	–0,7	5,9
Cisteína[e]	Cys C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn N	132	2,02	8,80		5,41	–3,5	4,3
Glutamina	Gln Q	146	2,17	9,13		5,65	–3,5	4,2
Grupos R cargados positivamente								
Lisina	Lys K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	–3,9	5,9
Histidina	His H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	–3,2	2,3
Arginina	Arg R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	–4,5	5,1
Grupos R cargados negativamente								
Aspartato	Asp D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	–3,5	5,3
Glutamato	Glu E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	–3,5	6,3

[a]Los valores de M_r reflejan las estructuras tal y como se muestran en la Figura 3-5. Los elementos del agua (M_r 18) se restan cuando el aminoácido se incorpora a un polipéptido.

[b]Una escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofilicidad de los grupos R. Los valores reflejan la energía libre (ΔG) de transferencia de la cadena lateral del aminoácido desde un disolvente hidrofóbico al agua. Esta transferencia es favorable (ΔG<0, valor negativo en el índice) para aminoácidos con cadena lateral cargada o polar, y desfavorable (ΔG>0, valor positivo en el índice) para aminoácidos con cadena lateral apolar o más hidrofóbica. Véase el Capítulo 11 . Tomado de J. Kyte y R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105, 1982.

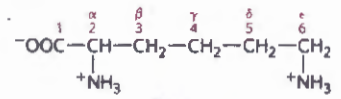
[c]Presencia media en más de 1.150 proteínas. Tomado de R.F. Doolittle en *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (g.D. Fassman, ed.), p.599, Plenum Press, 1989.

[d]Originalmente, el índice hidropático considera la frecuencia en la que un aminoácido aparece en la superficie de una proteína. Dado que la prolina aparece a menudo en la superficie en los giros β, su valor es inferior al que sería deducible a partir de su cadena lateral de grupos metileno.

[e]La cisteína se clasifica generalmente como polar a pesar de tener un índice de hidropatía positivo. Ello refleja la capacidad del grupo sulfidrilo para actuar como ácido débil y para formar enlaces de hidrógeno débiles con el oxígeno o el nitrógeno.

COPY-STATION

empezando a partir del carbono α. Para la mayoría de las demás moléculas orgánicas, los átomos de carbono se numeran simplemente a partir de un extremo, dando la máxima prioridad (C-1) al carbono con el sustituyente que contenga el átomo de mayor número atómico. Siguiendo esta última convención, el grupo carboxilo de un aminoácido sería el C-1 y el carbono α sería el C-2.



Lisina

En algunos casos, como en aminoácidos con grupos R heterocíclicos tales como la histidina, el sistema de

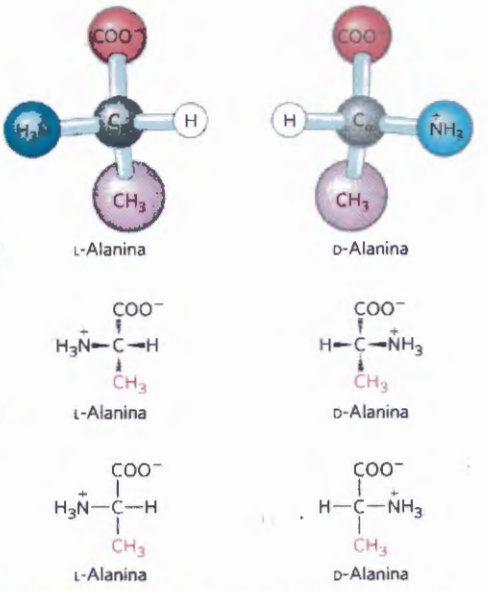


FIGURA 3-3 Estereoisomería en los a-aminoácidos. **(a)** Los dos estereoisómeros de la alanina, la L- y la D- alanina, son imágenes especulares no superponibles entre sí (enantiómeros). **(b, c)** Dos convenciones diferentes para mostrar la configuración en el espacio de los estereoisómeros. En las fórmulas de perspectiva **(b)** los enlaces con forma de cuña solida se proyectan fuera del plano del papel; los enlaces a trazos lo hacen por detrás. En las fórmulas de proyección **(c)** se supone que los enlaces horizontales se proyectan fuera del plano del papel y los enlaces verticales hacia atrás. No obstante, las fórmulas de proyección se utilizan a menudo de modo no sistemático, sin pretender representar una configuración estereoquímica específica.

letras griegas es ambiguo y se utiliza por ello la convención numérica. En aminoácidos con cadena lateral ramificada, los carbonos equivalentes reciben números a continuación de las letras griegas. La leucina tiene por tanto los carbonos $d1$ y $d2$ (véase la estructura en la Fig. 3-5). ‹‹

Para especificar la **configuración absoluta** de los cuatro sustituyentes de los átomos de carbono asimétricos se ha desarrollado una nomenclatura especial. Las configuraciones absolutas de los azúcares sencillos y los

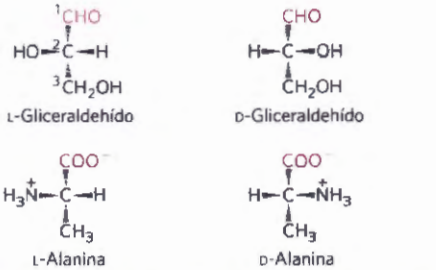


FIGURA 3-4 Relación estérica de los estereoisómeros de la alanina con la configuración absoluta del l- y d-gliceraldehído. En estas fórmulas de perspectiva los carbonos están alineados verticalmente con el átomo quiral en el centro. Los carbonos de estas moléculas están numerados empezando con los carbonos aldehído o carboxilo (en rojo), de 1 a 3 y de arriba a abajo tal como se muestra. Cuando se presentan de esta forma, el grupo R del aminoácido (en este caso el grupo metilo de la alanina) está siempre debajo del carbono α. Los L-aminoácidos son los que tienen el grupo α-amino a la izquierda y los D-aminoácidos los que tienen el grupo α-amino a la derecha.

aminoácidos se especifican mediante el **sistema D, L (Fig. 3-4),** basado en la configuración absoluta del azúcar de tres carbonos gliceraldehído, una convención propuesta por Emil Fischer en 1891. (Fischer conocía los grupos que rodean el átomo de carbono asimétrico del gliceraldehído pero tuvo que adivinar su configuración absoluta; su predicción fue correcta, tal como se confirmó posteriormente por análisis de difracción de rayos X). Para todos los compuestos quirales, los estereoisómeros que tienen una configuración relacionada con la del L-gliceraldehído se designan como L, y los estereoisómeros relacionados con el D-gliceraldehído se designan como D. Los grupos funcionales de la L-alanina se hacen coincidir con los del L-gliceraldehído alineando aquellos que pueden interconvertirse mediante reacciones químicas simples en un solo paso. Así, el grupo carboxilo de la L-alanina ocupa la misma posición respecto al carbono quiral que el grupo aldehído del L-gliceraldehído, puesto que un aldehído puede convertirse fácilmente (oxidarse) en un grupo carboxilo en un solo paso mediante una oxidación. Históricamente, las denominaciones L y D se utilizaron para levorrotatorio (que gira la luz polarizada en el plano hacia la izquierda) y dextrorrotatorio (que gira la luz hacia la derecha). Sin embargo, no todos los L-aminoácidos son levorrotatorios, por lo que se hizo necesaria la convención que se muestra en la Figura 3-4 para evitar posibles ambigüedades sobre la configuración absoluta. Según la convención de Fischer, L y D hacen referencia *solamente* a la configuración absoluta de los cuatro sustituyentes alrededor del carbono quiral y no a las propiedades ópticas de la molécula.

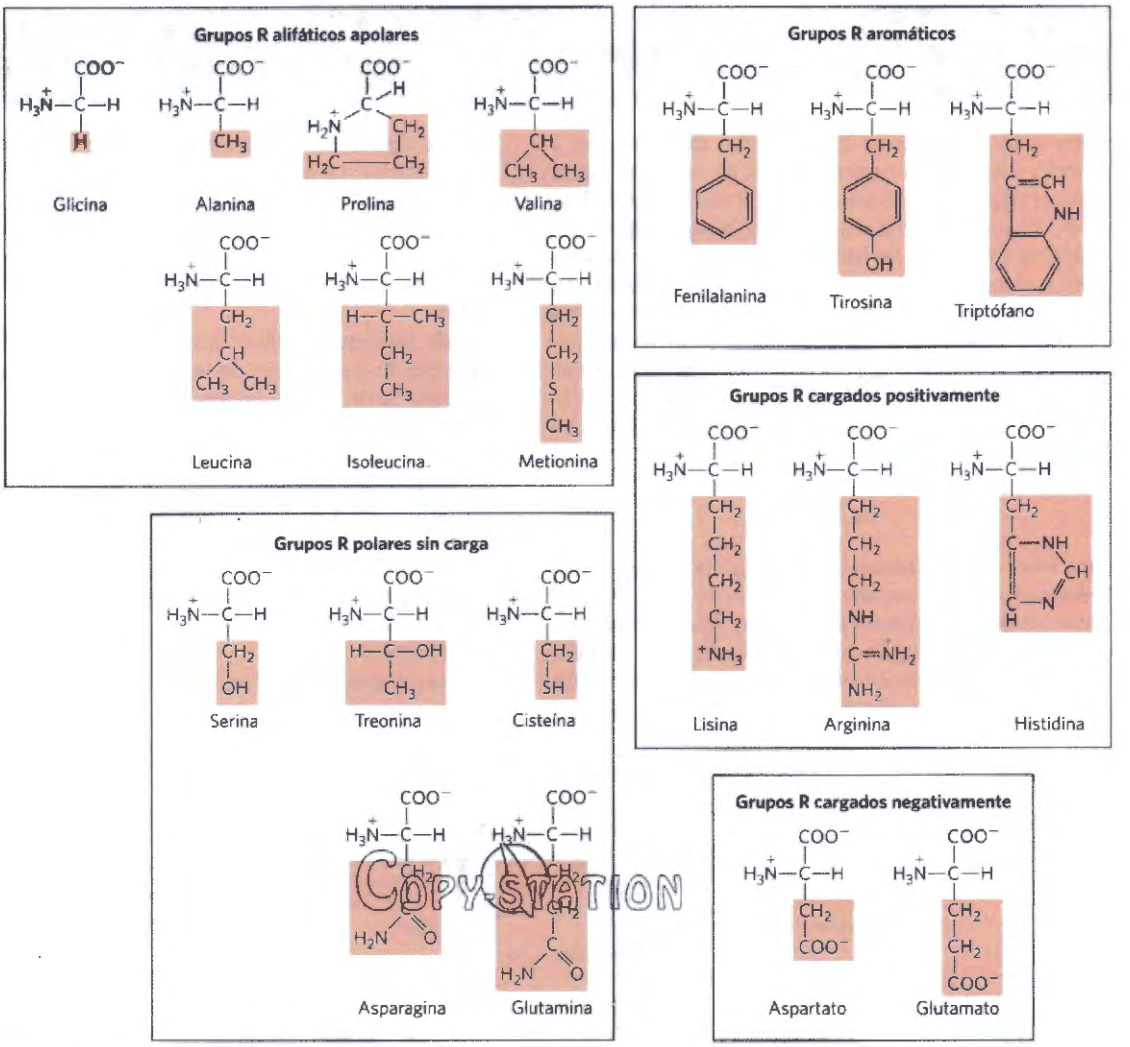
Otro sistema para especificar la configuración alrededor de un centro quiral es el **sistema RS**, que se utiliza en la nomenclatura sistemática de la química orgánica y que describe con mayor precisión la configuración de las moléculas con más de un centro quiral (véase p. 19).

COPY-STATION

Los residuos aminoácidos de las proteínas son estereoisómeros L

Casi todos los compuestos biológicos con un centro quiral se presentan en la naturaleza en una sola de sus formas estereoisómeras, sea la D o la L. Los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente L-estereoisómeros. Solo se han encontrado D-aminoácidos en unos pocos péptidos, generalmente pequeños, que incluyen algunos péptidos de las paredes celulares bacterianas y algunos antibióticos peptídicos.

Es un hecho notable que todos los aminoácidos de las proteínas sean L-estereoisómeros. Cuando se forman compuestos quirales en reacciones químicas ordinarias, el resultado es una mezcla racémica de isómeros D y L, que son difíciles de distinguir y aislar por el químico. Sin embargo, para los sistemas vivientes, los isómeros D y L son tan diferentes como la mano derecha y la izquierda. La formación de subestructuras estables y repetidas en las proteínas (Capítulo 4) requiere en general que los aminoácidos que las constituyen sean de una misma serie estereoquímica. Las células son capaces de sintetizar específicamente los isómeros L de los aminoácidos gracias a que los centros activos de los enzimas son asimétricos, lo que implica que las reacciones que catalizan sean estereoespecíficas.



COPY-STATION

FIGURA 3-5 Los 20 aminoácidos estándar de las proteínas. Las fórmulas estructurales muestran el estado de ionización que predomina a pH 7,0. Las partes no sombreadas son comunes para todos los aminoácidos; las partes sombreadas en rojo son los grupos R. Aunque el grupo R de la histidina se muestra sin carga, su pK_a (véase la Tabla 3-1) es tal que una fracción pequeña pero significativa de estos grupos está cargada positivamente a pH 7,0. La forma protonada de la histidina se muestra en la parte superior del gráfico de la Figura 3-12b.

Los aminoácidos se pueden clasificar según su grupo R

El conocimiento de las propiedades químicas de los aminoácidos estándar es de vital importancia para la comprensión de la bioquímica. El tema se puede simplificar agrupando los aminoácidos en cinco clases principales basadas en las propiedades de sus grupos R (Tabla 3-1), en especial su **polaridad**, o tendencia a interaccionar con el agua a pH biológico (cerca de pH 7,0). La polaridad de los grupos R varía enormemente desde totalmente apolar o hidrofóbico (insoluble en agua) a altamente polar o hidrofílico (soluble en agua). Algunos aminoácidos son algo difíciles de caracterizar o no encajan perfectamente en ningún grupo, en especial en los casos de glicina, histidina y cisteína. Su asignación a uno u otro grupo es, más que absoluta, aproximada.

En la **Figura 3-5** se muestran las estructuras de los 20 aminoácidos estándar, y algunas de sus propiedades se muestran en la Tabla 3-1. Dentro de cada clase existen gradaciones de polaridad, tamaño y forma de los grupos R.

Grupos R apolares alifáticos Los grupos R de esta clase de aminoácidos son apolares e hidrofóbicos. Las cadenas laterales de la **alanina**, **valina**, **leucina** e **isoleucina**, tienden a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras proteicas a través de interacciones hidrofóbicas. La **glicina** tiene la estructura más simple. Aunque se agrupa formalmente entre los aminoácidos apolares, su muy pequeña cadena lateral no contribuye al efecto hidrofóbico. La **metionina**, uno de los dos aminoácidos que contienen azufre, tiene un grupo tioéter apolar en su cadena lateral. La **prolina** tiene una cadena lateral alifática con una estructura cíclica distintiva. El grupo amino secundario (imino) de los residuos de prolina tiene una conformación rígida que reduce la flexibilidad estructural de las regiones polipeptídicas que contienen este aminoácido.

Grupos R aromáticos La **fenilalanina**, la **tirosina** y el **triptófano**, con sus cadenas laterales aromáticas, son relativamente apolares (hidrofóbicos). Todas ellas pueden contribuir al efecto hidrofóbico. El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno y constitu-

RECUADRO 3-1 MÉTODOS Absorción de la luz por las moléculas: Ley de Lambert-Beer

Una gran variedad de biomoléculas absorben luz a longitudes de onda características, de la misma forma que el triptófano absorbe luz a 280 nm (véase la Fig. 3-6). La medida de la absorción de la luz mediante un espectrofotómetro se utiliza para detectar e identificar moléculas y para calcular su concentración en disolución. La fracción de la luz incidente absorbida por una disolución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente (paso óptico) y con la concentración de la especie absorbente (Fig.1). Estas dos relaciones se combinan en la ley de Lambert-Beer,

$$\log\frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

en donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, el cociente I/I_0 (el inverso del cociente en la fórmula) es la transmitancia, ε es el coeficiente de absorción molar (en unidades de litros por mol-centímetro), c es la concentración de la especie absorbente (en moles por litro) y l el paso óptico de la muestra que absorbe la luz (en centímetros). La ley de Lambert-Beer supone que la luz incidente es paralela y monocromática (de una única longitud de onda) y que las moléculas de disolvente y de soluto están orientadas al azar. La expresión $\log(I_0/I)$ se denomina **absorbancia** y se designa por A.

Es importante hacer notar que cada milímetro sucesivo de paso óptico de la solución absorbente en una cubeta de 1,0 cm no absorbe una cantidad constante sino una fracción constante de la luz que incide en él. No obstante, con una capa absorbente de camino óptico fijo, *la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.*

El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente, la longitud de onda, y también con el pH si la especie absorbente de luz está en equilibrio con un estado de ionización que tiene diferentes propiedades de absorbancia.

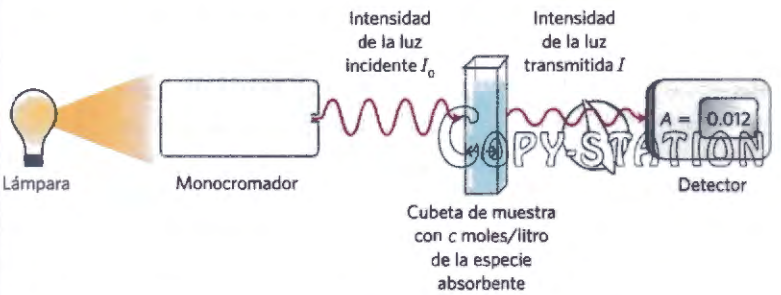


FIGURA 1 Componentes principales de un espectrofotómetro. Una fuente de luz emite en un amplio espectro. A continuación, el monocromador selecciona y transmite luz de una longitud de onda determinada. La luz monocromada pasa a través de la muestra situada en una cubeta de paso óptico l y la absorbancia de la muestra log (I_0/I) es proporcional a la concentración de la especie absorbente. La luz transmitida se mide mediante un detector.

ye un grupo funcional importante en algunos enzimas. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico del triptófano.

El triptófano y la tirosina, y en mucho menor grado la fenilalanina, absorben la luz ultravioleta (**Fig. 3-6**; véase también el Recuadro 3-1). Esto explica la fuerte absorbancia de la luz característica de la mayoría de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, propiedad aprovechada por los investigadores en la caracterización de las proteínas.

Grupos R polares sin carga Los grupos R de estos aminoácidos son más solubles en agua, o hidrofílicos, que los de los aminoácidos apolares, debido a que contienen grupos funcionales que forman puentes de hidrógeno con el agua. En esta clase de aminoácidos se incluyen la **serina**, **treonina**, **cisteína**, **asparagina** y **glutamina**. La polaridad de la serina y treonina proviene de sus grupos hidroxilo y la de la asparagina y glutamina de sus grupos

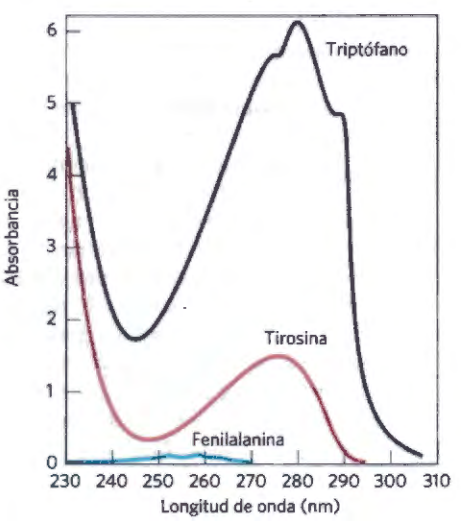


FIGURA 3-6 Absorbancia de la luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos. Comparación de los espectros de absorción de luz de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina a pH 6,0. Los aminoácidos están presentes en cantidades equimolares (10^{-3} M) en condiciones idénticas. La absorción de la luz por el triptófano es cuatro veces mayor que la de la tirosina a una longitud de onda de 280 nm. Obsérvese que el máximo de absorbancia tanto para el triptófano como para la tirosina está cercano a una longitud de onda de 280 nm. La absorción de luz por la fenilalanina, generalmente contribuye poco a las propiedades espectroscópicas de las proteínas.

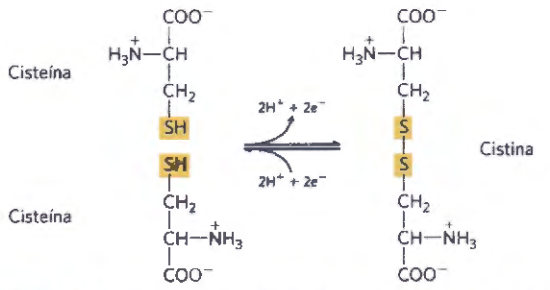


FIGURA 3-7 Formación reversible de un puente disulfuro por oxidación de dos moléculas de cisteína. Los puentes disulfuro entre residuos de Cys estabilizan la estructura de muchas proteínas.

amido. La cisteína es un caso especial porque su polaridad, aportada por el grupo sulfihidrilo, es muy discreta. La cisteína es un ácido débil y puede establecer enlaces de hidrógeno débiles con el oxígeno o el nitrógeno.

La asparagina y la glutamina son las amidas de otros dos aminoácidos que también se encuentran en las proteínas, aspartato y glutamato, respectivamente, a los que se hidrolizan fácilmente por ácido o base. La cisteína se oxida fácilmente formando un aminoácido dimérico unido covalentemente llamado **cistina**, en el que dos moléculas o residuos de cisteína están unidos a través de un enlace disulfuro **(Fig. 3-7)**. Los residuos unidos por un enlace disulfuro son fuertemente hidrofóbicos (apolares). Los enlaces disulfuro desempeñan un papel especial en la estructura de muchas proteínas al formar uniones covalentes entre partes de una molécula de proteína o entre dos cadenas proteicas diferentes.

Grupos R cargados positivamente (básicos) Los grupos R más hidrofílicos son aquellos que están cargados positiva o negativamente. Los aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga neta positiva a pH 7,0 son la **lisina**, que tiene un grupo amino primario adicional en la posición ε de su cadena alifática; la **arginina**, que tiene un grupo guanidinio cargado positivamente; y la **histidina** que contiene un grupo imidazol aromático. Al ser el único aminoácido común que posee una cadena lateral ionizable con un pK_a próximo a la neutralidad, la histidina tanto puede estar cargada positivamente (forma protonada) como no tener carga a pH 7,0. Los residuos de His facilitan muchas reacciones catalizadas por enzimas al servir de dadores/aceptores de protones.

Grupos R cargados negativamente (ácidos) Los dos aminoácidos que tienen grupos R con una carga neta negativa a pH 7,0 son el **aspartato** y el **glutamato**, cada uno de los cuales tiene un segundo grupo carboxilo.

Los aminoácidos no estándar tienen también importantes funciones

Además de los 20 aminoácidos estándar, las proteínas pueden contener residuos creados por modificación de los residuos estándar ya incorporados a un polipéptido **(Fig. 3-8a)**. Entre los aminoácidos no estándar están la **4-hidroxiprolina**, que es un derivado de la prolina y la **5-hidroxilisina**, derivada de la lisina. La primera se encuentra en la pared celular de plantas y ambas se encuentran en el colágeno, una proteína fibrosa del tejido conjuntivo. La **6-*N*-metil-lisina** es un constituyente de la miosina, una proteína contráctil del músculo. Otro aminoácido no estándar importante es el **γ-carboxiglutamato** que se encuentra en la proteína protrombina que interviene en la coagulación de la sangre, así como en ciertas otras proteínas que unen Ca^{2+} como parte de su función biológica. Más compleja es la **desmosina**, que es un derivado de cuatro residuos diferentes de Lys y que se encuentra en la proteína fibrosa elastina.

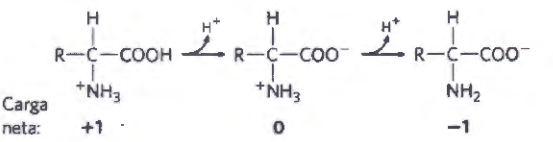
La **selenocisteína** y la **pirrolisina** son dos casos especiales. Estos residuos raros no son el resultado de una modificación postsintética, sino que son introducidos durante la síntesis de proteínas gracias a una adaptación poco frecuente del código genético descrito en el Capítulo 27. La selenocisteína contiene selenio en lugar del azufre de la cisteína. La selenocisteína, que de hecho proviene de la serina, se encuentra en sólo unas pocas proteínas conocidas. La pirrolisina se encuentra en un limitado número de proteínas de varias arqueas metanogénicas (productoras de metano) y en una bacteria; desempeña su función en la biosíntesis de metano.

Algunos de los residuos aminoácidos de una proteína pueden ser modificados de forma transitoria para alterar la función de la proteína. La adición de grupos fosforilo, metilo, acetilo, adenililo, ADP-ribosilo u otros a aminoácidos específicos puede aumentar o disminuir la actividad de la proteína (Fig. 3-8b). La fosforilación es una modificación reguladora muy común. La estrategia reguladora consistente en la modificación covalente de proteínas se discute con más detalle en el Capítulo 6.

Se han encontrado alrededor de otros 300 aminoácidos en las células. Tienen funciones diversas pero no forman parte de proteínas. La **ornitina** y la **citrulina** (Fig. 3-8c) merecen mención especial porque son intermediarios clave (metabolitos) en la biosíntesis de la arginina (Capítulo 22) y en el ciclo de la urea (Capítulo 18).

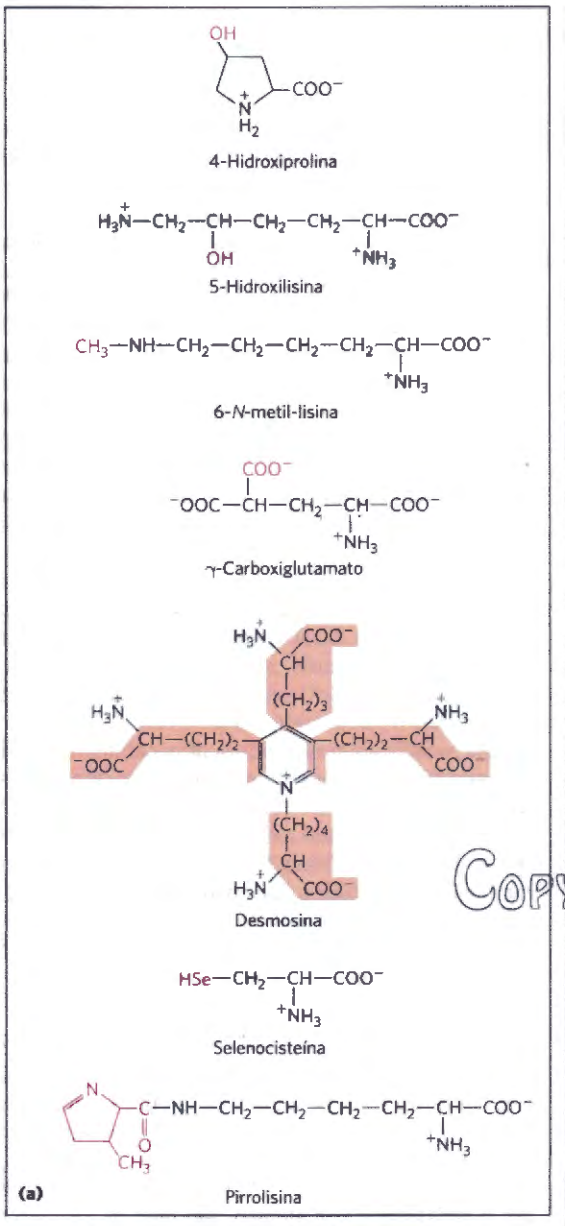
Los aminoácidos pueden actuar como ácidos y como bases

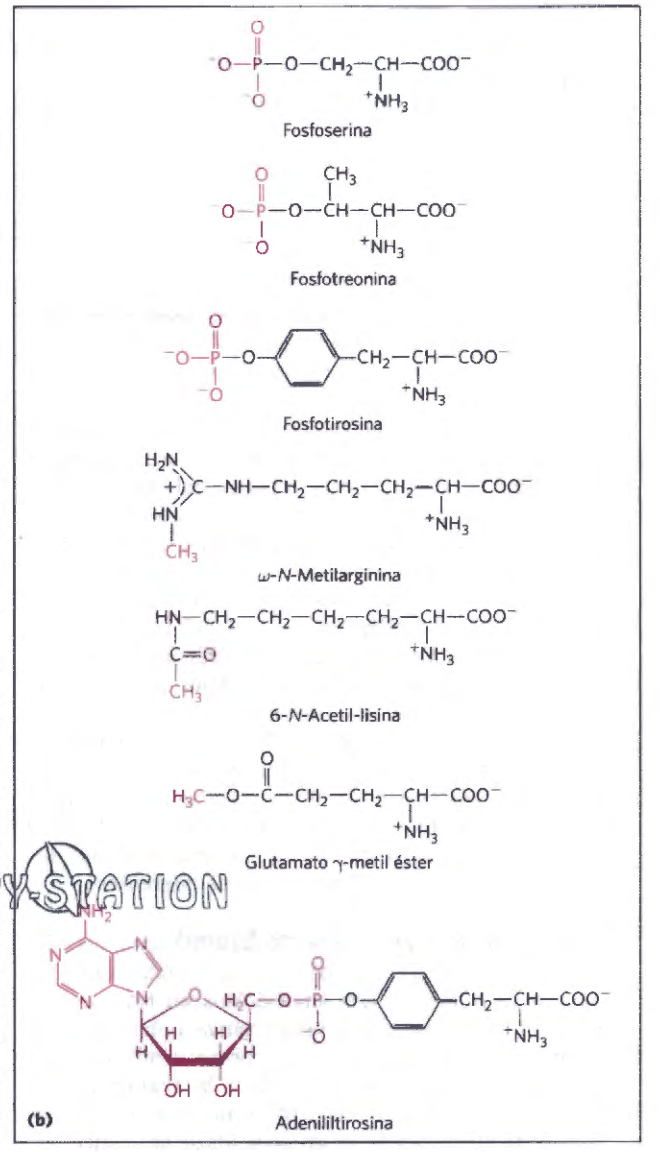
Los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos, junto con los grupos R ionizables de algunos aminoácidos, actúan como ácidos y bases débiles. Cuando un aminoácido sin grupo R ionizable se disuelve en agua a pH neutro, se encuentra en solución en forma de ion dipolar, o **zwitterion** (en alemán "ion híbrido"), que puede actuar como ácido o como base **(Fig. 3-9)**. Las sustancias con esta naturaleza dual son **anfóteras** y, a menudo, se denominan **anfolitos**, (de "electrolitos anfóteros"). Un α-aminoácido sencillo monoamínico y monocarboxílico, tal como la alanina, es un ácido diprótico cuando está totalmente protonado; tiene dos grupos, el grupo —COOH y el grupo $—NH_3^+$, que se pueden liberar protones:



Los aminoácidos tienen curvas de titulación características

La titulación ácido-base implica la adición o eliminación gradual de protones (Capítulo 2). La **Figura 3-10** muestra la curva de titulación de la forma diprótica de la glicina. Los dos grupos ionizables de la glicina, el





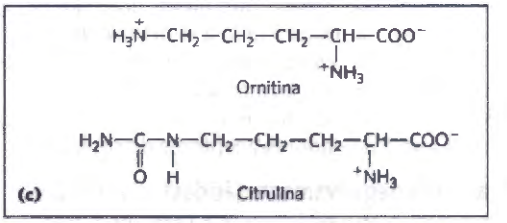


FIGURA 3-8 Aminoácidos no estándar. (a) Algunos aminoácidos no estándar encontrados en proteínas. La mayoría provienen de aminoácidos estándar. (Obsérvese el uso alternativo de números o de letras griegas en los nombres de estas estructuras para identificar los átomos de carbono alterados.) Los grupos funcionales extra añadidos a través de reacciones de modificación se muestran en rojo. La desmosina se forma a partir de cuatro residuos de Lys, (los cuatro esqueletos carbonados están sombreados en rojo pálido). La selenocisteína y la pirrolisina son excepciones: estos dos aminoácidos se añaden durante la síntesis proteica normal mediante una expansión altamente especializada del código genético estándar descrita en el Capítulo 27. Ambos se encuentran en un número muy pequeño de proteínas. **(b)** Modificaciones reversibles de aminoácidos implicadas en la regulación de la actividad de proteínas. La fosforilación es la modificación covalente reguladora más frecuente. **(c)** Ornitina y citrulina, que no se encuentran en proteínas, son intermediarios en la biosíntesis de arginina y en el ciclo de la urea.

COPY-STATION

grupo carboxílico y el grupo amino, se titulan con una base fuerte como el NaOH. La gráfica tiene dos etapas distintas, que corresponden a la desprotonación de dos grupos diferentes de la glicina. Cada una de las etapas se asemeja en su forma a la curva de titulación de un ácido monoprótico tal como el ácido acético (véase la Fig. 2-17), y puede analizarse de la misma manera. A pH muy bajo, la especie iónica predominante de la glicina es $^{+}H_3N{-}CH_2{-}COOH$, la forma totalmente protonada. En la primera etapa de la titulación, el grupo —COOH de la glicina pierde su protón. En el punto medio de esta epata existen concentraciones equimolares del dador de protones ($^{+}H_3N{-}CH_2{-}COOH$) y del aceptor de protones ($^{+}H_3N{-}CH_2{-}COO^{-}$). Como ocurre en la

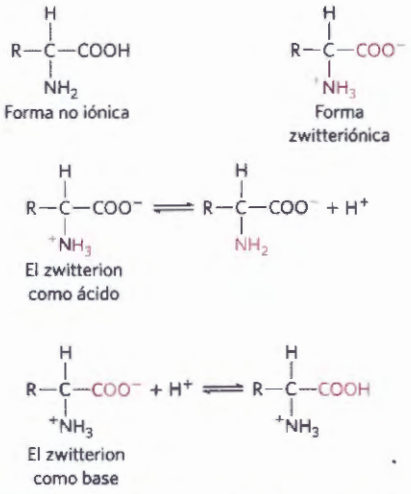


FIGURA 3-9 Formas no iónica y zwitteriónica de los aminoácidos. La forma no iónica no se encuentra en cantidades significativas en disoluciones acuosas. El zwitterion predomina a pH neutro. Un zwitterion puede actuar como ácido (dador de protones) o como base (aceptor de protones).

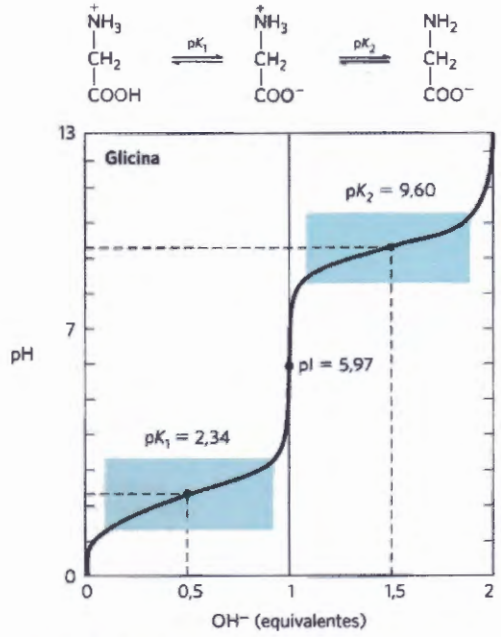


FIGURA 3-10 Titulación de un aminoácido. Se muestra aquí la curva de titulación de glicina 0,1 M a 25°C. La especie iónica predominante en puntos clave de la titulación se muestran encima de la gráfica. Los recuadros sombreados, centrados alrededor de $pK_1 = 2,34$ y $pK_2 = 9,60$ indican las regiones de máximo poder tamponante. Observe que 1 equivalente de OH^- = 0,1 M NaOH añadido.

titulación de cualquier ácido débil, en este punto medio se alcanza un punto de inflexión en que el pH es igual al pK_a del grupo protonado que se está titulando (véase la Fig. 2-18). Para la glicina, el pH en el punto medio es 2,34 y por lo tanto su grupo —COOH tiene un pK_a (rotulado como pK_1 en la Fig. 3-10) de 2,34. (Recuérdese del Capítulo 2 que pH y pK_a son simplemente notaciones útiles de la concentración de protones y de la constante de equilibrio de ionización, respectivamente. El pK_a es una medida de la tendencia de un grupo a ceder un protón, tendencia que disminuye en un factor de 10 cada vez que el pK_a se incrementa en una unidad). A medida que avanza la titulación de la glicina se alcanza otro punto importante a pH 5,97. Aquí hay otro punto de inflexión en el que la eliminación del primer protón es prácticamente completa mientras que tan sólo se ha iniciado la eliminación del segundo. A este pH la glicina se encuentra mayoritariamente en forma del ion dipolar (zwitterion) $^+H_3N—CH_2—COO^-$. Pronto volveremos sobre el significado de este punto de inflexión en la curva de titulación (señalado como pI en la Fig. 3-10).

La segunda etapa de la titulación corresponde a la eliminación de un protón del grupo $—NH_3^+$ de la glicina. El pH en el punto medio de esta etapa es 9,60, igual al pK_a (rotulado pK_2 en la Fig. 3-10) del grupo $—NH_3^+$. La titulación es prácticamente completa a un pH alrededor de 12, en donde la forma predominante de la glicina es $H_2N—CH_2—COO^-$.

A partir de la curva de titulación de la glicina se pueden deducir diversas informaciones interesantes. En primer lugar, da una medida cuantitativa del pK_a de cada uno de los dos grupos ionizables: 2,34 para el —COOH y 9,60 para el grupo $—NH_3^+$. Obsérvese que el grupo carboxilo de la glicina es más de 100 veces más ácido (se ioniza más fácilmente) que el grupo carboxilo del ácido acético, que, como vimos en el Capítulo 2, tiene un pK_a de 4,76, cercano al promedio para un grupo carboxílico unido a un hidrocarburo alifático sin más sustituyentes. La perturbación del pK_a de la glicina está causada principalmente por el cercano grupo amino cargado positivamente del átomo de carbono α, un grupo electronegativo que tiende a atraer electrones como se describe en la **Figura 3-11**. Las cargas opuestas en el zwitterion resultante tienen un efecto estabilizante. De modo similar, el pK_a del grupo amino de la glicina es menor que el pK_a medio de un grupo amino. Este efecto es debido en parte a los átomos de oxígeno electronegativos del grupo carboxilo, que tienden a atraer electrones hacia ellos, aumentando así la tendencia del grupo amino a ceder un protón. Por tanto, el grupo α-amino tiene un pK_a menor que el de una amina alifática como la metilamina (Fig. 3-11). En resumen, el pK_a de cualquier grupo funcional está fuertemente afectado por su entorno químico, un fenómeno que a veces es utilizado en los sitios activos de los enzimas para promover mecanismos de reacción exquisitamente adaptados que dependen de los valores perturbados de los pK_a de grupos dadores/aceptores de protones de residuos específicos.

La segunda información que proporciona la curva de titulación de la glicina es que este aminoácido tiene dos regiones con capacidad tamponante. Una de estas es la porción relativamente plana de la curva que abarca alrededor de una unidad de pH a cada lado del primer pK_a de 2,34, lo que indica que la glicina es un buen tampón cerca de este pH. La otra zona de tamponamiento está centrada alrededor de pH 9,60. (Obsérvese que la glicina no es un buen tampón al pH del fluido intracelular o de la sangre, que es de alrededor de 7,4.) Dentro de los márgenes de tamponamiento de la glicina, se puede utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular las proporciones de especies dadora y aceptora de protones de la glicina que se requieren para preparar un tampón a un pH determinado.

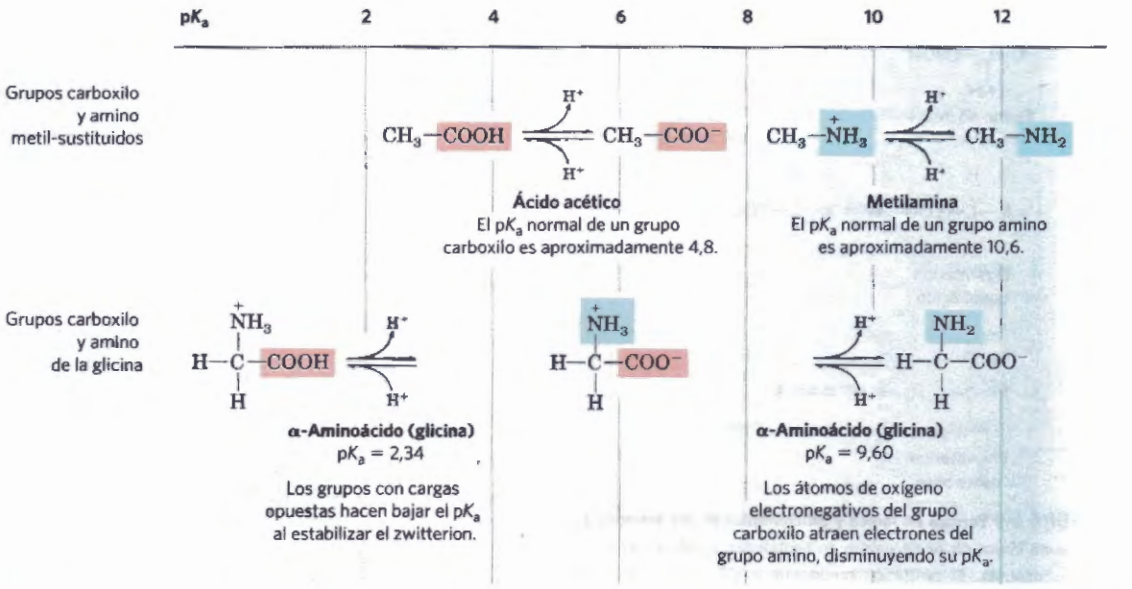


FIGURA 3-11 Efecto del entorno químico en el pK_a. Los valores de pK_a para los grupos ionizables de la glicina son menores que los de los grupos amino y carboxilo sustituidos simplemente por un metilo. Estas perturbaciones que hacen bajar el pK_a son debidas a interacciones intramoleculares. Efectos similares pueden ser causados por grupos químicos que resultan estar posicionados en las cercanías de un grupo ionizable, por ejemplo, en el sitio activo de un enzima.

La curva de titulación predice la carga eléctrica de los aminoácidos

Otra información importante deducida de la curva de titulación de un aminoácido es la relación entre su carga eléctrica neta y el pH de la disolución. A pH 5,97, punto de inflexión entre las dos etapas de su curva de titulación, la glicina está presente de manera predominante en su forma dipolar, totalmente ionizada pero sin carga eléctrica *neta* (Fig. 3-10). El pH característico en que la carga eléctrica *neta* es cero se denomina **punto isoeléctrico** o **pH isoeléctrico**, designado **pI**. En el caso de la glicina, que no tiene grupo ionizable en su cadena lateral, el punto isoeléctrico es simplemente la media aritmética de los dos valores de pK_a:

$$\text{pI} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2) = \frac{1}{2}(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$$

Como resulta evidente de la Figura 3-10, la glicina tiene una carga neta negativa a cualquier pH por encima de su pI, por lo que se desplazará hacia el electrodo positivo (el ánodo) cuando se coloque en un campo eléctrico. A cualquier pH por debajo de su pI, la glicina tiene una carga neta positiva, y se desplazará hacia el electrodo negativo (el cátodo). Cuanto más alejado esté el pH de una disolución de glicina de su punto isoeléctrico, mayor será la carga eléctrica neta de la población de moléculas de glicina. Por ejemplo, a pH 1,0 la glicina se encuentra enteramente en su forma $^+H_3N—CH_2—COOH$ con una carga positiva neta de 1,0. A pH 2,34, en el que hay una mezcla paritaria de $^+H_3N—CH_2—COOH$ y $^+H_3N—CH_2—COO^-$, la carga positiva neta o promedio es de 0,5. De la misma manera se puede predecir el signo y la magnitud de la carga neta de cualquier aminoácido a cualquier pH.

Los aminoácidos difieren en sus propiedades ácido-base

Las propiedades compartidas por muchos aminoácidos permiten algunas simplificaciones generales acerca de su comportamiento ácido-base. En primer lugar, todos los aminoácidos con un solo grupo α-amino, un solo grupo α-carboxilo y un grupo R no ionizable tienen curvas de titulación parecidas a la de la glicina (Fig. 3-10). Estos aminoácidos tienen valores de pK_a muy similares, aunque no idénticos: el pK_a de los grupos —COOH está en el intervalo de 1,8 a 2,4 y el pK_a de los grupos $—NH_3^+$ en el intervalo de 8,8 a 11,0 (Tabla 3-1). Las diferencias en los valores de pK_a reflejan el entorno químico que representan sus grupos R. En segundo lugar, los aminoácidos con un grupo R ionizable tienen curvas de titulación más complejas, con *tres* etapas correspondientes a los tres pasos de ionización posibles; tienen por tanto tres valores de pK_a. La etapa adicional debida a la titulación del grupo R ionizable se fusiona en cierto grado con la de la titulación el grupo α–carboxilo, con la de la titulación del grupo α–amino o con las dos. En la **Figura 3-12** se muestran las curvas de titulación de dos aminoácidos de este tipo, glutamato e histidina. Los puntos isoeléctricos reflejan la naturaleza de los grupos R ionizables presentes. Por ejemplo, el glutamato tiene un pI de 3,22, considerablemente inferior al de la glicina. Esto es el resultado de la presencia de dos grupos carboxilo que, en el promedio de sus valores de pK_a (3,22) contribuyen con una carga negativa neta de –1 que equilibra la de +1 debida al grupo amino. De modo semejante, el pI de la histidina, con dos grupos cargados positivamente cuando están protonados, es de 7,59 (el promedio de los valores de pK_a de los grupos amino e imidazol), mucho mayor que el de la glicina.

Finalmente, y como se ha indicado anteriormente, en las condiciones generales de exposición libre y abier-

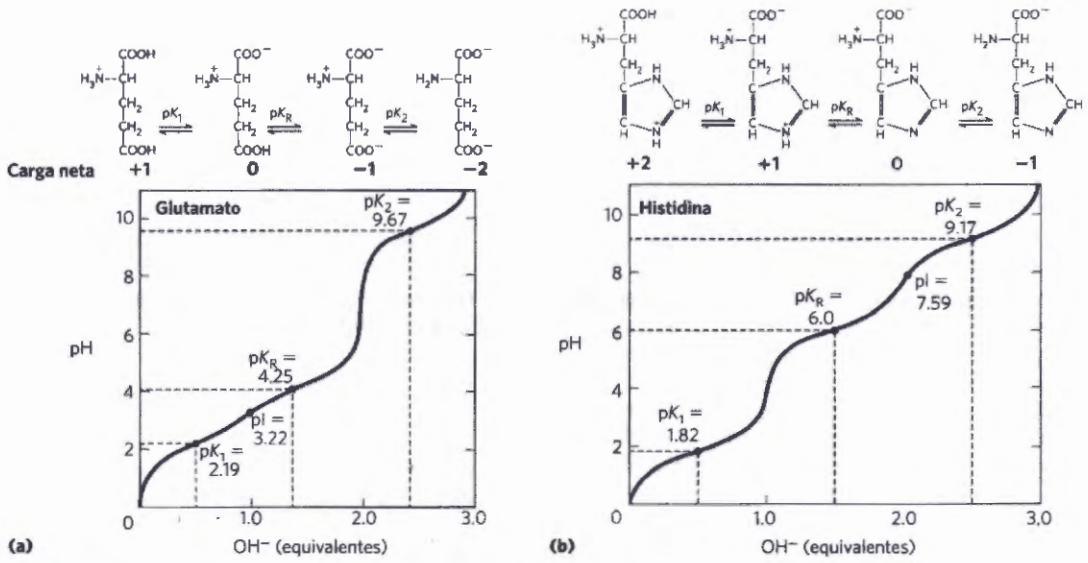


FIGURA 3-12 Curvas de titulación de **(a)** glutamato y **(b)** histidina. El pK_a del grupo R se designa pK_R.

ta al entorno acuoso, sólo la histidina tiene un grupo R (pK_a = 6,0) que proporciona poder tamponante significativo al pH cercano a la neutralidad presente normalmente en los fluidos extra e intracelulares de la mayoría de animales y bacterias (Tabla 3-1).

RESUMEN 3.1 Aminoácidos

- Los 20 aminoácidos que se encuentran normalmente como residuos en las proteínas contienen un grupo α-carboxilo, un grupo α-amino y un grupo R característico unido al carbono α. El átomo de carbono α de todos los aminoácidos excepto la glicina es asimétrico, por lo que los aminoácidos pueden existir en al menos dos formas estereoisoméricas. En proteínas tan solo se encuentran los estereoisómeros L, cuya configuración está relacionada con la de la molécula de referencia, L-gliceraldehído.
- También existen otros aminoácidos menos comunes, ya sea como constituyentes de las proteínas (mediante la modificación de los aminoácidos estándar después de la síntesis de proteínas) o como metabolitos libres.
- Los aminoácidos se clasifican en cinco tipos en base a la polaridad y carga de sus grupos R (a pH 7).
- Los aminoácidos se diferencian en sus propiedades ácido-base y tienen curvas de titulación características. Los aminoácidos monoamino-monocarboxílicos (con grupos R no ionizables) son ácidos dipróticos ($^+H_3NCH(R)COOH$) a pH bajo y existen en diversas formas diferentes al ir aumentando el pH. Los aminoácidos con grupos R ionizables poseen especies iónicas adicionales, en función del pH del medio y del pK_a del grupo R.

3.2 Péptidos y proteínas

Ahora nos ocuparemos de los polímeros de los aminoácidos, los **péptidos** y las **proteínas**. Los polipéptidos que se encuentran en la naturaleza varían en tamaño desde pequeñas moléculas que contienen dos o tres aminoácidos a moléculas muy grandes que contienen miles de ellos. Aquí nos centraremos en las propiedades químicas fundamentales de estos polímeros.

Los péptidos son cadenas de aminoácidos

Dos moléculas de aminoácidos se pueden unir de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, denominado **enlace peptídico**, con formación de un dipéptido. Este enlace se forma por eliminación de los elementos del agua (deshidratación) del grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino de otro **(Fig. 3-13)**. La formación del enlace peptídico es un ejemplo de una reacción de condensación, que es un tipo de reacción frecuente en las células vivas. En condiciones bioquímicas normales, el equilibrio de la reacción que se muestra en la Figura 3-13 favorece a los aminoácidos por encima del dipéptido. Para conseguir que la reacción sea termodinámicamente más favorable, es necesario modificar o activar químicamente el grupo carboxilo de modo que su grupo hidroxilo pueda ser eliminado más fácilmente. Al final de este capítulo se esquematiza una aproximación química a este problema. La aproximación biológica a la formación del enlace peptídico es un tema principal del Capítulo 27.

Es posible unir tres aminoácidos mediante dos enlaces peptídicos para formar un tripéptido; de manera similar se pueden unir cuatro aminoácidos para dar un tetrapéptido, cinco para formar un pentapéptido y así sucesivamente. Cuando se unen unos pocos aminoácidos de este modo, la estructura resultante se denomina **oligopéptido**. Cuando se unen muchos aminoácidos el producto se denomina **polipéptido**. Las proteínas pueden tener miles de residuos aminoácidos. Aunque a veces los términos "polipéptido" y "proteína" son intercambiables, las moléculas denominadas polipéptidos tienen generalmente masas moleculares inferiores a 10.000 y los que se denominan proteínas tienen masas moleculares superiores.

La **Figura 3-14** muestra la estructura de un pentapéptido. Como ya se ha indicado, las unidades de ami-

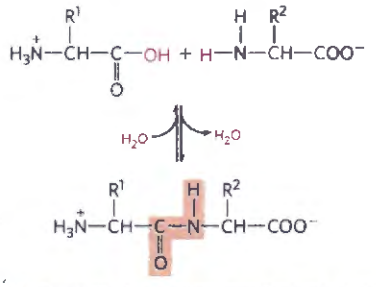


FIGURA 3-13 Formación de un enlace peptídico por condensación. El grupo α-amino de un aminoácido (con el grupo R^2) actúa como nucleófilo desplazando el grupo hidroxilo de otro aminoácido (con el grupo R^1), para formar un enlace peptídico (sombreado en rojo pálido). Los grupos amino son buenos nucleófilos, pero el grupo hidroxilo es un mal grupo saliente por lo que no es desplazado fácilmente. A pH fisiológico, la reacción, tal como se muestra, no tiene lugar de forma apreciable.

noácido de un péptido se denominan frecuentemente residuos (la parte que queda tras perder los elementos del agua, un átomo de hidrógeno de su grupo amino y el hidroxilo de su grupo carboxilo). El residuo aminoácido del extremo de un péptido que tiene un grupo α-amino libre es el residuo **amino-terminal** (o *N*-terminal); el residuo del otro extremo, que tiene un grupo carboxilo libre, es el residuo **carboxilo-terminal** (*C*-terminal).

» Convención Clave: Cuando se escribe la secuencia de un péptido, polipéptido o proteína, el extremo amino-terminal se coloca a la izquierda y el extremo carboxilo-terminal a la derecha. La secuencia se lee de izquierda a derecha empezando por el residuo amino-terminal. **«**

Aunque la hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción exergónica, sólo tiene lugar lentamente debido a su alta energía de activación (véase la p. 28). En consecuencia, los enlaces peptídicos de las proteínas son muy estables, con una vida media ($t_{1/2}$) de alrededor de 7 años en la mayoría de condiciones intracelulares.

Los péptidos pueden distinguirse por su comportamiento de ionización

Los péptidos contienen tan solo un grupo α-amino y un grupo α-carboxilo libres, uno en cada extremo de la cadena **(Fig. 3-15)**. Estos grupos se ionizan de la misma manera que lo hacen en los aminoácidos libres. Los grupos α-amino y α-carboxilo de todos los aminoácidos no terminales están unidos covalentemente en forma de enlaces peptídicos, que no se ionizan y, por tanto, no contribuyen al comportamiento total ácido-base de los péptidos. No obstante, los grupos R de algunos aminoácidos pueden ionizarse (Tabla 3-1), y contribuyen en un péptido a las propiedades ácido-base globales de la molécula (Fig. 3-15). Por tanto, puede predecirse el comportamiento ácido-base de un péptido a partir de sus grupos α-amino y α-carboxilo libres y de la naturaleza y número de sus grupos R ionizables.

Al igual que los aminoácidos libres, los péptidos tienen curvas de titulación características y pH isoeléctricos (pI) característicos en los que no sufren desplazamiento en un campo eléctrico. Estas propiedades se aprovechan en algunas de las técnicas utilizadas para

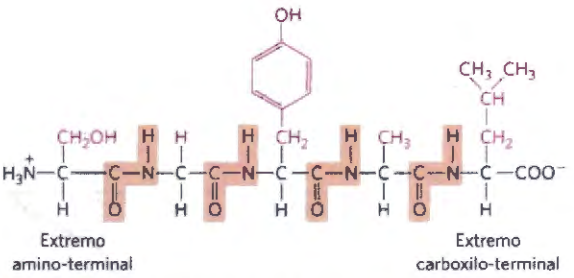


FIGURA 3-14 El pentapéptido serilgliciltirosilalanilleucina, o Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu, o SGYAL. Los péptidos se nombran empezando por el residuo amino-terminal que, por convención, se sitúa a la izquierda. Los enlaces peptídicos se muestran sombreados en rojo pálido y los grupos R en rojo.

separar péptidos y proteínas, como veremos posteriormente en este capítulo. Debe ponerse de relieve que el valor del pK_a de un grupo R ionizable puede cambiar algo cuando un aminoácido se convierte en el residuo de un péptido. La pérdida de carga en los grupos α-carboxilo y α-amino, las interacciones con otros grupos R del péptido, y otras condiciones del entorno pueden afectar al pK_a. Los valores de pK_a para los grupos R que se muestran en la Tabla 3-1 pueden ser una guía útil para deducir el intervalo de pH en que un determinado grupo se ionizará, pero no pueden aplicarse estrictamente a los aminoácidos que pasan a formar parte de un péptido.

Copy-station

Los péptidos y polipéptidos biológicamente activos se presentan en una gran variedad de composición y tamaño

No es posible generalizar acerca de las masas moleculares de los péptidos y proteínas biológicamente activos en relación con su función. La longitud de los péptidos naturales varía entre dos aminoácidos y muchos miles de residuos. Incluso los péptidos más pequeños pueden tener efectos biológicamente importantes. Considere por ejemplo el dipéptido sintético comercial L-aspartil-L-fenilalanina metil éster, un edulcorante artificial más conocido como aspartamo o NutraSweet.

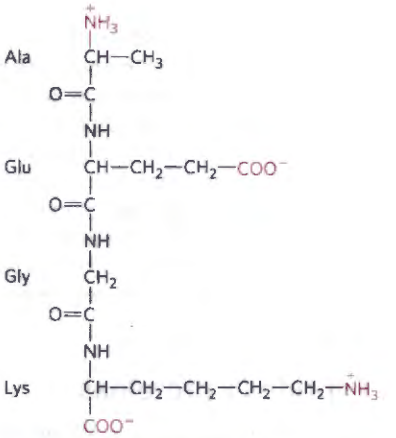
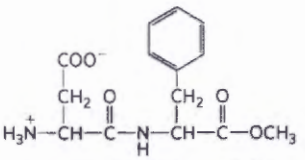


FIGURA 3-15 Alanilglutamilglicillisina. Este tetrapéptido tiene un grupo α-amino libre, un grupo α-carboxilo libre, y dos grupos R ionizables. Los grupos ionizados a pH 7,0 se muestran en rojo.

TABLA 3-2 Datos moleculares de algunas proteínas

Proteína	Masa molecular	Número de residuos	Número de cadenas polipeptídicas
Citocromo c (humano)	12.400	104	1
Ribonucleasa A (páncreas bovino)	13.700	124	1
Lisozima (clara de huevo de gallina)	14.300	129	1
Mioglobina (corazón de caballo)	16.700	153	1
Quimotripsina (páncreas bovino)	25.200	241	3
Quimotripsinógeno (bovino)	25.700	245	1
Hemoglobina (humana)	64.500	574	4
Albúmina sérica (humana)	66.000	609	1
Hexoquinasa (levadura)	107.900	972	2
RNA polimerasa *(E. coli)*	450.000	4.158	5
Apolipoproteína B (humana)	513.000	4.536	1
Glutamina sintetasa *(E. coli)*	619.000	5.628	12
Titina (humana)	2.993.000	26.926	1



L-Aspartil-L-fenilalanina metil éster (aspartamo)

Muchos péptidos pequeños tienen efecto a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, diversas hormonas de vertebrados son péptidos pequeños (Capítulo 23). Entre éstas se incluye la oxitocina (nueve residuos aminoácidos), que es secretada por la hipófisis posterior y estimula las contracciones uterinas, y el factor liberador de la tirotropina (tres residuos), que se forma en el hipotálamo y estimula la liberación de otra hormona, la tirotropina, de la hipófisis anterior. Algunos venenos de setas extremadamente tóxicos, tales como la amanitina, también son péptidos pequeños, lo mismo que muchos antibióticos.

¿Qué longitud tienen las cadenas polipeptídicas de las proteínas? Tal como muestra la Tabla 3-2, la longitud varía considerablemente. El citocromo *c* humano tiene 104 residuos aminoácidos unidos en una única cadena; el quimotripsinógeno bovino tiene 245 residuos. En el extremo se encuentra la titina, un constituyente del músculo de los vertebrados, que tiene cerca de 27.000 residuos aminoácidos y una masa molecular de alrededor de 3.000.000. La inmensa mayoría de los polipéptidos naturales son mucho más pequeños y contienen menos de 2.000 residuos aminoácidos.

Algunas proteínas consisten en una sola cadena polipeptídica, pero otras, denominadas proteínas con **subunidades múltiples**, tienen dos o más polipéptidos asociados de forma no covalente (Tabla 3-2). Las cadenas polipeptídicas individuales en una proteína con múltiples subunidades pueden ser idénticas o diferentes. Si como mínimo dos son idénticas, la proteína se denomina **oligomérica**, y las subunidades idénticas (constituidas por una o más cadenas polipeptídicas) se denominan **protómeros**. La hemoglobina, por ejemplo, tiene cuatro subunidades polipeptídicas: dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas, unidas todas ellas entre sí por interacciones no covalentes. Cada subunidad α está unida de forma idéntica con una subunidad β dentro de la estructura de esta proteína con múltiples subunidades, de forma que la hemoglobina puede considerarse bien como un tetrámero de cuatro subunidades polipeptídicas o un dímero de protómeros αβ.

Unas pocas proteínas contienen una o más cadenas polipeptídicas unidas covalentemente. Por ejemplo, las dos cadenas polipeptídicas de la insulina están unidas entre sí a través de puentes disulfuro. En estos casos, los polipéptidos individuales no se consideran subunidades, sino que se suelen denominar simplemente cadenas.

La composición de aminoácidos de las proteínas es también altamente variable. En una proteína casi nunca se encuentran los 20 aminoácidos en cantidades iguales. Algunos se dan tan solo una vez, o ninguna, en un tipo determinado de proteína mientras que en otras se dan numerosas veces. La Tabla 3-3 muestra la composición amimoacídica del citocromo *c* bovino y del quimotripsinógeno, el precursor inactivo del enzima digestivo quimotripsina. Estas dos proteínas, con funciones muy diferentes, también difieren significativamente en las cantidades relativas de cada tipo de residuo aminoácido.

Se puede calcular el número aproximado de residuos aminoácidos de una proteína sencilla que no contenga ningún otro grupo químico, dividiendo su masa molecular por 110. Aunque la masa molecular media de los 20 aminoácidos estándar es alrededor de 138, en la mayoría de proteínas predominan los aminoácidos más pequeños. Si se tienen en cuenta las proporciones en que se presentan los distintos aminoácidos en una proteína estándar (Tabla 3-1; el valor promedio se determina analizando las composiciones aminoacídicas de más de 1.000 proteínas diferentes), la masa molecular media está próxima a 128. Dado que se elimina una molécula de agua (M_r 18) para crear cada enlace peptídico, la masa molecular media de un residuo aminoácido en una proteína está alrededor de 128 – 18 = 110.

Algunas proteínas contienen grupos químicos diferentes a los aminoácidos

Muchas proteínas, tales como los enzimas ribonucleasa y quimotripsina, contienen sólo aminoácidos y ningún otro grupos químico adicional; a este tipo de proteínas se las considera proteínas simples. Sin embargo, algunas proteínas contienen componentes químicos diferentes a los aminoácidos asociados permanentemente; estas proteínas se denominan **proteínas conjugadas**. La parte no aminoacídica de una proteína conjugada se denomina usualmente **grupo prostético**. Las proteínas conjugadas se clasifican según la naturaleza química de su grupo prostético (Tabla 3-4); por ejemplo, las **lipoproteínas** contienen lípidos, las **glucoproteínas** contienen grupos glucídicos, y las **metaloproteínas** contienen un metal específico. Algunas proteínas contienen más de un grupo prostético. Normalmente el grupo prostético juega un papel importante en la función biológica de la proteína.

RESUMEN 3.2 Péptidos y proteínas

- Los aminoácidos pueden unirse covalentemente para formar péptidos y proteínas. Las células contienen generalmente miles de proteínas diferentes, cada una de ellas con una actividad biológica distinta.
- Las proteínas pueden ser cadenas polipeptídicas muy largas de 100 a varios millares de residuos aminoácidos. Sin embargo, algunos péptidos naturales tienen sólo unos pocos aminoácidos. Algunas proteínas están compuestas por varias cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente que reciben el nombre de subunidades.
- Las proteínas simples generan tan solo aminoácidos después de la hidrólisis; las proteínas conjugadas contienen algún otro componente adicional, como por ejemplo un metal o un grupo prostético orgánico.

3.3 Trabajar con proteínas

El conocimiento bioquímico sobre la estructura y función de las proteínas procede del estudio de muchas proteínas individuales. Para estudiar una proteína con cierto detalle es necesario separarla del resto de proteínas y disponer de técnicas que permitan determinar sus propiedades. Los métodos necesarios provienen de la química de proteínas, disciplina tan antigua como la bioquímica y que mantiene una posición central en la investigación bioquímica.

TABLA 3-3 Composición de aminoácidos de dos proteínas

	Citocromo *c* bovino		Quimotripsinógeno bovino	
Aminoácido	Número de residuos por molécula	Porcentaje del total[a]	Número de residuos por molécula	Porcentaje del total[a]
Ala	6	6	22	9
Arg	2	2	4	1,6
Asn	5	5	14	5,7
Asp	3	3	9	3,7
Cys	2	2	10	4
Gln	3	3	10	4
Glu	9	9	5	2
Gly	14	13	23	9,4
His	3	3	2	0,8
Ile	6	6	10	4
Leu	6	6	19	7,8
Lys	18	17	14	5,7
Met	2	2	2	0,8
Phe	4	4	6	2,4
Pro	4	4	9	3,7
Ser	1	1	28	11,4
Thr	8	8	23	9,4
Trp	1	1	8	3,3
Tyr	4	4	4	1,6
Val	3	3	23	9,4
Total	104	102	245	99,7

Nota: En algún tipo de análisis, como en la hidrólisis ácida, Asp y Asn no se distinguen y se designan Asx (o B). De manera similar no es posible distinguir Glu y Gln, que se designan Glx (o Z). Además, se destruye el Trp . Deben emplearse procedimientos adicionales para determinar correctamente el contenido total en aminoácidos.

[a]Los porcentajes no suman 100% a causa del redondeo.

COPY-STATION

TABLA 3-4 Proteínas conjugadas

Clase	Grupo prostético	Ejemplo
Lipoproteínas	Lípidos	Lipoproteína β_1 de la sangre
Glucoproteínas	Glúcidos	Inmunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína de la leche
Hemoproteínas	Hemo (ferroporfirina)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleótidos de flavina	Succinato deshidrogenasa
Metaloproteínas	Hierro	Ferritina
	Zinc	Alcohol deshidrogenasa
	Calcio	Calmodulina
	Molibdeno	Dinitrogenasa
	Cobre	Plastocianina

Las proteínas se pueden separar y purificar

Una preparación pura de una proteína es esencial para poder determinar sus propiedades y su actividad. Puesto que las células contienen miles de tipos diferentes de proteínas, ¿cómo puede purificarse una proteína? Los métodos clásicos de separación de proteínas aprovechan propiedades que varían de una proteína a otra, entre las que se incluye el tamaño, la carga y las propiedades de unión. A estos métodos se han añadido, durante las décadas recientes, otros nuevos como el clonaje de DNA y la secuenciación de genomas que pueden simplificar el proceso de purificación de proteínas. Estos métodos modernos, presentados en los Capítulos 7 y 8 y 9, suelen modificar artificialmente la proteína a purificar adicionando unos pocos o muchos aminoácidos a uno de los extremos o a ambos. De este modo, la simplificación del proceso puede implicar una alteración potencial de la actividad de la proteína purificada. La purificación de proteínas en su estado nativo (la forma en la que funcionan en la célula) suele basarse en los métodos aquí descritos.

La fuente de una proteína son generalmente células tisulares o microbianas. El primer paso en cualquier purificación de proteínas es la rotura de estas células para liberar sus proteínas en una solución denominada **extracto crudo**. En caso necesario puede utilizarse la centrifugación diferencial para preparar fracciones subcelulares o aislar determinados orgánulos (véase la Fig. 1-9).

Una vez está a punto el extracto o la preparación de orgánulo, se dispone de diversos métodos para purificar una o más de las proteínas que contienen. Normalmente, el extracto se somete a tratamientos que separan las proteínas en diferentes **fracciones** en base a alguna propiedad tal como el tamaño o la carga, un proceso que se denomina **fraccionamiento**. Los pasos iniciales de fraccionamiento en una purificación utilizan diferencias en la solubilidad de las proteínas, que es una función compleja del pH, la temperatura, la concentración de sal y otros factores. La solubilidad de las proteínas disminuye en presencia de algunas sales, un efecto denominado "salting out" (salado). La adición de ciertas sales en cantidades apropiadas puede precipitar selectivamente algunas proteínas, permaneciendo las restantes en disolución. El sulfato amónico ($(NH_4)_2SO_4$) es especialmente efectiva y a menudo se utiliza para precipitar proteínas por salado. Las proteínas así precipitadas se separan de las que permanecen disueltas mediante centrifugación a baja velocidad.

La disolución que contiene la proteína de interés debe pasar a menudo por otros procesos antes de que sean posibles pasos de purificación posteriores. La **diálisis**, por ejemplo, es un procedimiento que separa las proteínas de los solutos pequeños aprovechando el mayor tamaño de las proteínas. El extracto parcialmente purificado se coloca en un saco o tubo de membrana semipermeable. Cuando éste se suspende en un volumen mucho mayor de disolución tamponada de fuerza iónica apropiada, la membrana permite el intercambio de sal y tampón, pero no de proteínas. De esta forma, la diálisis retiene las proteínas grandes dentro del saco o tubo de membrana, mientras que permite que la concentración de los demás solutos en la preparación de proteína cambie hasta llegar al equilibrio con la solución del exterior de la membrana. La diálisis puede utilizarse, por ejemplo, para eliminar el sulfato amónico de una preparación de proteína.

Los métodos más potentes para el fraccionamiento de proteínas utilizan la **cromatografía de columna**, que aprovecha las diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión, y otras propiedades de las proteínas **(Fig. 3-16)**. Un material sólido poroso de propiedades químicas adecuadas (la fase estacionaria) se introduce en una columna, y una disolución tamponada (la fase móvil) pasa a su través. La proteína, disuelta en la misma disolución tamponada de la fase móvil, se deposita en la parte superior de la columna. A continuación, va percolando a través de la matriz sólida, en forma de una banda que va expandiéndose continuamente dentro de la fase móvil. Las proteínas individuales migran más rápido o más lentamente a través de la columna dependiendo de sus propiedades.

La **cromatografía de intercambio iónico** aprovecha las diferencias en el signo y la magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado **(Fig. 3-17a)**. La matriz de la columna es un polímero sintético (resina) que tiene unidos grupos cargados; los que tienen unidos grupos aniónicos se denominan **intercambiadores catiónicos**, y los que tienen unidos grupos catiónicos se denominan **intercambiadores aniónicos**. La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la columna está afectada por

el pH (que determina el estado de ionización de la molécula) y la concentración de los iones salinos libres competidores presentes en la disolución que las rodea. La separación puede optimizarse cambiando gradualmente el pH y/o la concentración de sal de la fase móvil, de forma que se cree un gradiente de pH o de sal. En la **cromatografía de intercambio catiónico**, la matriz sólida tiene grupos cargados negativamente. En la fase móvil, las proteínas con carga neta positiva migran a través de la matriz más lentamente que las que tienen una carga neta negativa debido a que la migración de las primeras se halla retardada por sus interacciones con la fase estacionaria.

En las columnas de intercambio iónico, la expansión de la banda de proteínas en la fase móvil (la disolución de proteínas) está causada tanto por la separación de las proteínas de diferentes propiedades como por la difusión. La resolución entre dos tipos de proteínas con diferente carga neta suele mejorar a medida que se aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, la velocidad a la que la disolución de proteínas puede pasar a través de la columna suele disminuir con la longitud de la misma. A medida que aumenta el tiempo de residencia en la columna, la resolución puede disminuir como resultado de la difusión de cada una de las bandas de proteína. Se van recogiendo porciones (fracciones) sucesivas de efluente en tubos de ensayo a medida que la solución que contiene las proteínas va saliendo de la columna. Se puede analizar cada fracción para averiguar la presencia de la proteína de interés o para conocer otras propiedades, como la fuerza iónica o la concentración total de proteína. Todas las fracciones que contienen la proteína de interés pueden combinarse para obtener el producto de este paso cromatográfico en la purificación de la proteína.

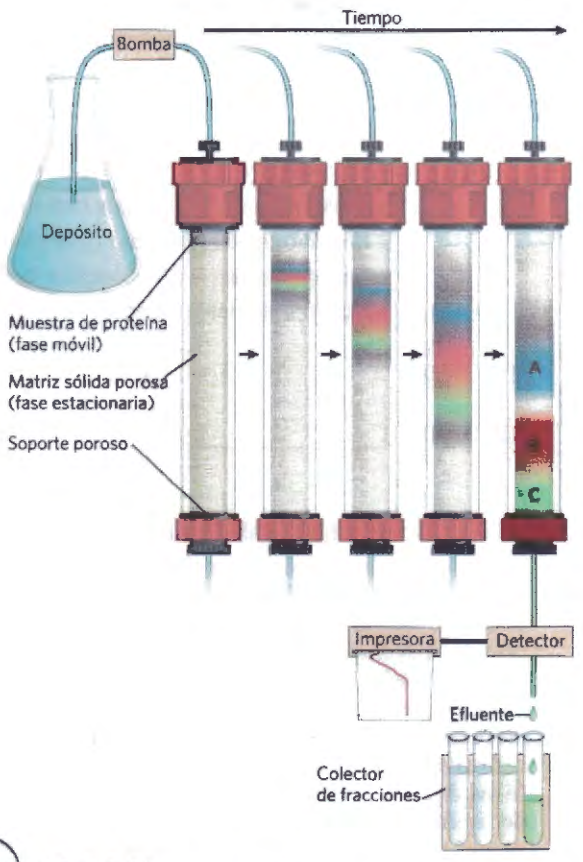


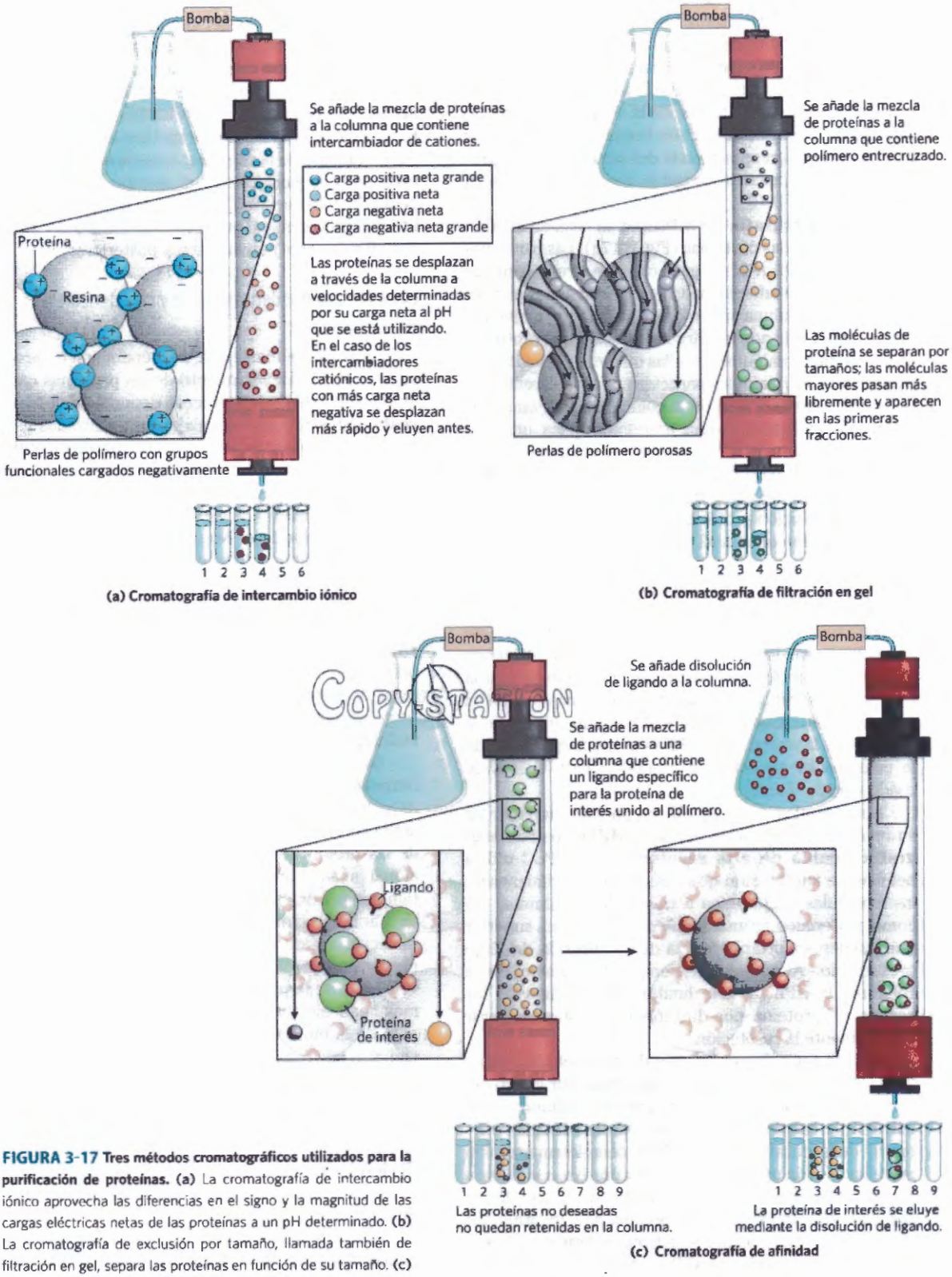
FIGURA 3-16 Cromatografía en columna. Los elementos estándar de una columna cromatográfica incluyen un material sólido poroso (matriz), que se deposita en el interior de una columna hecha generalmente de plástico o vidrio. Una disolución, la fase móvil, fluye a través de la matriz, la fase estacionaria. La disolución que sale de la columna por la parte inferior (el efluente), es reemplazada constantemente por disolución suministrada de un depósito en la parte superior. La disolución de proteína a separar se deposita sobre la cabeza de la columna y se deja percolar hacia el interior de la matriz sólida. Se añade más disolución sobre ella. La disolución de proteína forma una banda dentro de la fase móvil que tiene inicialmente la anchura de la disolución de proteína aplicada a la columna. A medida que las proteínas se desplazan a través de la columna (aquí se muestran cinco tiempos diferentes del proceso), se retardan en diferentes grados en virtud de su interacción diferencial con el material de la matriz. Así, la banda de proteína se va ensanchando a medida que se mueve a través de la columna. Los tipos individuales de proteínas (tales como A, B y C, mostradas en azul, rojo y verde) se separan gradualmente entre sí, formando bandas dentro de la banda más ancha de proteínas. La separación mejora (aumenta la resolución) a medida que aumenta la longitud de la columna. Sin embargo, cada banda de proteína individual también se ensancha con el tiempo debido a la difusión, un proceso que disminuye la resolución. En este ejemplo, la proteína A está bien separada de B y C, pero el ensanchamiento por difusión impide la separación completa de B y C en estas condiciones.

EJEMPLO PRÁCTICO 3-1 Intercambio iónico de péptidos

Un bioquímico quiere separar dos péptidos mediante cromatografía de intercambio iónico. Al pH de la fase móvil que se va a utilizar en la columna, un péptido (A) tiene una carga neta de –3 debido a la presencia de más residuos Glu y Asp que residuos Arg, Lys e His. El péptido B tiene una carga neta de +1. ¿Qué péptido eluirá antes en una resina de intercambio catiónico? ¿Cuál de ellos eluiría primero en una resina de intercambio aniónico?

Solución: La resina de intercambio catiónico tiene cargas negativas y se une a moléculas cargadas positivamente, retardando su paso a través de la columna. El péptido B, con su carga neta positiva, interaccionará más fuertemente con la resina de intercambio catiónico que el péptido A, por lo que este último eluirá antes. El péptido B eluirá antes en la resina de intercambio aniónico. En este caso, el péptido A, de carga negativa, se encontrará retardado a causa de su interacción con la resina cargada positivamente.

La Figura 3-17 muestra otras dos variantes de cromatografía en columna además de la de intercambio iónico. La **cromatografía de exclusión molecular**, también llamada de filtración en gel (Fig. 3-17b), separa proteínas en base a su tamaño. En este método, las proteínas de mayor tamaño emergen de la columna antes que las pequeñas, un resultado que parece extraño a primera vista. La fase sólida consiste en unas pequeñas perlas hechas de material entrecruzado, partículas que contienen unos poros o cavidades de tamaño calibrado.



COPY-STATION

FIGURA 3-17 Tres métodos cromatográficos utilizados para la purificación de proteínas. **(a)** La cromatografía de intercambio iónico aprovecha las diferencias en el signo y la magnitud de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado. **(b)** La cromatografía de exclusión por tamaño, llamada también de filtración en gel, separa las proteínas en función de su tamaño. **(c)** La cromatografía de afinidad separa las proteínas en función de su especificidad de unión. En el texto de dan detalles adicionales sobre estos métodos.

Las proteínas de mayor tamaño no pueden entrar en las cavidades, por lo que toman un camino más corto (y más rápido) a través de la columna, rodeando las partículas por el exterior. Las proteínas más pequeñas penetran en las cavidades y son retardadas a causa de su paso más laberíntico a través de la columna. La cromatografía de exclusión molecular también se puede usar para la estimación aproximada del tamaño de una proteína purificada, usando métodos similares a los descritos en la Figura 3-19.

La **cromatografía de afinidad** se basa en la afinidad de unión de las proteínas (Fig. 3-17c). Las partículas de la columna tienen en este caso un grupo químico unido covalentemente llamado ligando, un grupo o molécula que se une a una macromolécula, como por ejemplo una proteína. Cuando se carga una mezcla de proteínas en la columna, cualquiera de ellas que tenga afinidad por este ligando se unirá a las partículas de resina, retardando su migración a través de la columna. Por ejemplo, si la función biológica de una proteína implica unión al ATP, la fijación a las partículas de la columna de una molécula que se parezca al ATP dará lugar a una matriz de afinidad que servirá para purificar la proteína. Al ir pasando la solución proteica a través de la columna, las proteínas que se unen a ATP (incluyendo la proteína de interés) se irán uniendo a la matriz. Después de eluir las proteínas que no se unen, aquellas que sí lo han hecho se eluyen con una solución que contenga o bien una alta concentración de sal o bien el propio ligando, en este caso ATP. La sal debilita la unión de la proteína al ligando inmovilizado unido a las partículas, interfiriendo con la interacciones iónicas. El ligando libre compite con el ligando unido a las partículas de la columna, liberando la proteína de la matriz; el producto proteico que eluye de la columna se encuentra a menudo unido al ligando usado para la elución.

Los métodos cromatográficos pueden incrementar su rendimiento gracias al uso de la **HPLC**, o **cromatografía líquida de alta resolución**. La HPLC utiliza bombas de alta presión que aceleran el movimiento de las moléculas de proteína a través de la columna, así como materiales cromatográficos de calidad superior que pueden soportar la fuerza de compresión del flujo presurizado. Al reducir el tiempo de tránsito en la columna, la HPLC puede limitar la expansión de las bandas de proteína por difusión y por tanto mejorar notablemente la resolución.

La estrategia de purificación de una proteína que no ha sido previamente aislada se guía tanto por los precedentes establecidos como por el sentido común. En la mayoría de casos deben utilizarse varios métodos diferentes consecutivos para purificar completamente una proteína, y cada uno de ellos separa proteínas en base a propiedades diferentes. Por ejemplo, si en uno de los pasos se separan proteínas de unión a ATP de otras que no lo unen, el paso siguiente deberá separar las diferentes proteínas de unión a ATP en base a su carga o su tamaño con el fin de aislar la proteína concreta que se desee. La elección de métodos es, en cierto modo, empírica, y puede ser necesario probar muchos protocolos antes de encontrar el más efectivo. El proceso de prueba y error puede a menudo reducirse al mínimo tomando como referencia técnicas de purificación desarrolladas para proteínas similares. Se pueden encontrar publicados protocolos de purificación para muchos millares de proteínas. El sentido común indica que al principio, cuando el volumen total y el número de contaminantes son máximos, se han de utilizar procedimientos baratos, como el salado. A menudo los métodos cromatográficos no resultan prácticos en las primeras fases debido a que la cantidad de medio cromatográfico necesario aumenta con el tamaño de la muestra. A medida que se completa cada paso de purificación, el tamaño de la muestra es generalmente menor (Tabla 3-5), lo que hace posible utilizar procedimientos cromatográficos más sofisticados (y más caros) en las etapas posteriores.

Las proteínas pueden separarse y caracterizarse por electroforesis

Otra importante técnica para la separación de proteínas se hasa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, proceso denominado **electroforesis**. Estos procedimientos no son utilizados generalmente para purificar proteínas en grandes cantidades dado que existen usualmente métodos alternativos más sencillos y que los métodos electroforéticos suelen afectar negativamente a la estructura y por tanto a la función de las proteínas. No obstante, la electroforesis es sumamente importante como método analítico. Su ventaja es que las proteínas pueden visualizarse además de separarse, lo que permite al investigador hacer una estimación rápida del número de proteínas diferentes en una mezcla o del grado de pureza de una preparación proteica determinada. La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína tales como su punto isoeléctrico y su masa molecular aproximada.

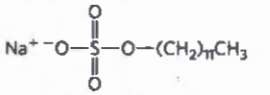
COPY-STATION

La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles formados por el polímero entrecruzado poliacrilamida **(Fig. 3-18)**. El gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando la migración de las proteínas de manera aproximadamente proporcional a su cociente carga/masa. El desplazamiento también puede estar afectado por la forma de la proteína. En la electroforesis, la fuerza que mueve la macromolécula es el potencial eléctrico, E. La movilidad electroforética de la molécula, μ, es el cociente entre la velocidad de la partícula, V, y el potencial eléctrico. La movilidad electroforética también es igual a la carga neta de la molécula, Z, dividida por el coeficiente friccional, f, que refleja en parte la forma de la proteína. Así:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

El desplazamiento de una proteína en un gel durante una electroforesis es, por tanto, función de su tamaño y de su forma.

Un método electroforético comúnmente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular emplea el detergente **dodecil sulfato sódico (SDS)** ("dodecil" se refiere a una cadena de 12 átomos de carbono).



dodecil sulfato sódico (SDS)

TABLA 3-5 Tabla de purificación para un enzima hipotético

Procedimiento o paso	Volumen de la fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)
Extracto celular crudo	1.400	10.000	100.000	10
Precipitación con sulfato amónico	280	3.000	96.000	32
Cromatografía de intercambio iónico	90	400	80.000	200
Cromatografía de exclusión por tamaño	80	100	60.000	600
Cromatografía de afinidad	6	3	45.000	15.000

Nota: Todos los datos representan el estado de la muestra *después* de haber efectuado el procedimiento indicado. La actividad y la actividad específica se definen en la página 95. Después del paso 5, el enzima ha sido purificado en un factor de 1.500, como se deduce del incremento en actividad específica relativa al extracto crudo, mientras que el rendimiento es del 45%, calculable a partir de la recuperación de actividad total.

Una proteína se une aproximadamente a una cantidad de SDS equivalente a 1,4 veces su masa, casi una molécula de SDS por cada residuo aminoácido. El SDS ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante y confiere a todas las proteínas un cociente carga/masa similar. Además, la unión de SDS despliega parcialmente las proteínas, de modo que la mayoría de las proteínas unidas al detergente adoptan una forma similar de varilla alargada. La electroforesis en presencia de SDS separa, por tanto, las proteínas casi exclusivamente en función de la masa molecular, de forma que los polipéptidos pequeños se desplazan más rápidamente. Después de la electroforesis las proteínas se visualizan añadiendo un colorante como el azul Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel (Fig. 3-18b). De esta forma puede seguirse el progreso de un procedimiento de purificación de una proteína, ya que el número de bandas de proteína visibles en el gel debe disminuir tras cada nuevo paso de purificación. Cuando se compara con las posiciones a las que se desplazan en el gel proteínas de masa molecular conocida, la posición de una proteína desco-

COPY-STATION

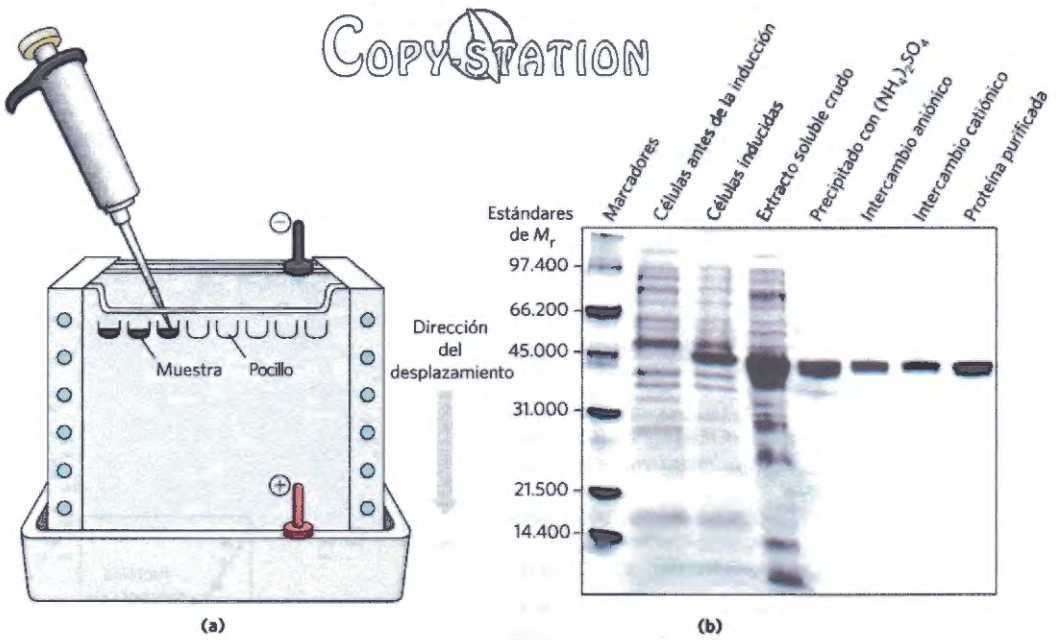


FIGURA 3-18 Electroforesis. (a) Se cargan diferentes muestras en los pocillos o depresiones en la parte superior de un gel de poliacrilamida con SDS. Las proteínas se desplazan a través del gel cuando se aplica un campo eléctrico. El gel mantiene al mínimo las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, y también minimiza los movimientos de proteínas que no sean los producidos por el campo eléctrico. **(b)** Después de la electroforesis se pueden visualizar las proteínas tratando el gel con un colorante tal como el azul de Coomassie, que se fija a las proteínas pero no al gel. Cada banda del gel representa una proteína diferente (o subunidad proteica); las proteínas más pequeñas se desplazan a través del gel más rápidamente que las proteínas grandes por lo que se encuentran cerca del extremo inferior del gel. Este gel ilustra la purificación la proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita en el Capítulo 25). Se clonó el gen de la proteína RecA (capítulo 9) de modo que se podía controlar su expresión (síntesis de la proteína). El primer carril muestra un conjunto de proteínas estándar (de M_r conocida) que sirven como marcadores de masa molecular. En los dos carriles siguientes se muestran proteínas de células de *E. coli* antes y después de la inducción de la síntesis de la proteína RecA. El cuarto carril muestra las proteínas de un extracto celular crudo. Los carriles siguientes (de izquierda a derecha) muestran las proteínas presentes después de cada paso sucesivo de purificación. La proteína purificada es una cadena polipeptídica única (M_r ~38.000), como puede apreciarse en el carril más a la derecha. [Fuente: (b) Dr. Julia Cox.]

nocida puede proporcionar una buena aproximación de su masa molecular **(Fig. 3-19)**. Si la proteína tiene dos o más subunidades diferentes, las subunidades se separarán generalmente a consecuencia del tratamiento con SDS y aparecerá una banda individual para cada una.

El **enfoque isoeléctrico** es un procedimiento utilizado para determinar el punto isoeléctrico (pI) de una proteína **(Fig. 3-20)**. Se establece un gradiente de pH dejando que una mezcla de ácidos y bases orgánicos de baja masa molecular (anfolitos; p. 81) se distribuya espontáneamente en un campo eléctrico generado a través del gel. Cuando se aplica una mezcla de proteínas, cada una de ellas se desplaza hasta que alcanza el pH que coincide con su pI. De este modo las proteínas con distintos puntos isoeléctricos se distribuyen de manera diferente a lo largo del gel.

La combinación secuencial del enfoque isoeléctrico y la electroforesis en SDS en un proceso denominado **electroforesis bidimensional** permite la resolución de mezclas complejas de proteínas **(Fig. 3-21)**. Éste es un método analítico más sensible que cualquier método electroforético individual. La electroforesis bidimensional separa proteínas de idéntica masa molecular que difieren en pI, o proteínas con valores de pI similares pero con diferentes masas moleculares.

Es posible cuantificar proteínas no aisladas

A fin de purificar una proteína es esencial disponer de un método para detectar y cuantificar dicha proteína en presencia de muchas proteínas más en cada etapa del proceso. A menudo, la purificación debe realizarse en ausencia de cualquier información sobre el tamaño y las propiedades físicas de la proteína, o sobre la fracción que representa sobre la masa total de proteína en el extracto. En el caso de proteínas enzimáticas, se puede determinar la cantidad de enzima en una disolución o extracto de tejido en función del efecto catalítico que produce el enzima, es decir, el *incremento* de la velocidad a la cual su sustrato se convierte en productos de la reacción cuando está presente el enzima. Con este fin debe conocerse (1) la ecuación global de la reacción catalizada, (2) un procedimiento analítico para determinar la desaparición de sustrato o la aparición de un producto de la reacción, (3) si el enzima requiere cofactores tales como iones metálicos o coenzimas, (4) la dependencia de la actividad enzimática respecto de la concentración de sustrato, (5) el pH óptimo y (6) una zona de temperatura en la cual el enzima sea estable y tenga una actividad elevada. Los enzimas se ensayan normalmente en su pH óptimo y a una temperatura adecuada dentro del intervalo de 25 a 38 °C. También se requieren generalmente elevadas concentraciones de sustrato de modo que la velocidad inicial de reacción, que se mide experimentalmente, sea proporcional a la concentración de enzima (Capítulo 6).

Por acuerdo internacional, se define 1,0 unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1,0 *m*mol de sustrato en producto por minuto a 25 °C en condiciones óptimas de medida (para algunos enzimas esta definición puede no ser conveniente por lo que se puede definir la unidad de modo diferente). El término **actividad** se refiere a las unidades totales de enzima en una solución. La **actividad específica** es el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína total **(Fig. 3-22)**. La actividad específica constituye una medida de la pureza enzimática: aumenta durante la purificación de una enzima, y llega a ser máxima y constante cuando el enzima es puro (Tabla 3-5).

Después de cada paso de purificación, se determina la actividad de la preparación (en unidades de acti-

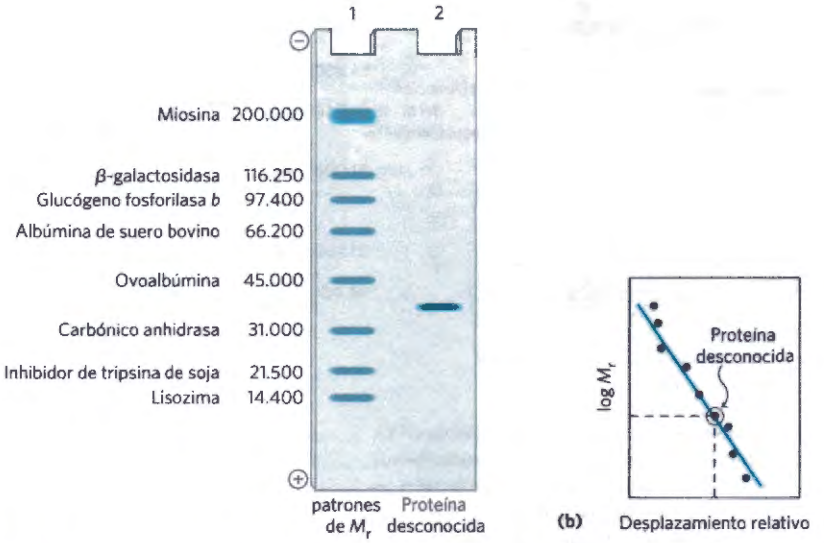


FIGURA 3-19 Determinación de la masa molecular de una proteína. La movilidad electroforética de una proteína en un gel de poliacrilamida con SDS es proporcional a su masa molecular, M_r. **(a)** Proteínas patrón de masa molecular conocida se someten a electroforesis (carril 1). Estas proteínas marcadoras se pueden utilizar para calcular la masa molecular de una proteína desconocida (carril 2). **(b)** Una gráfica del log M_r de las proteínas marcadoras frente al desplazamiento relativo durante la electroforesis es lineal, lo que permite leer la masa molecular de la proteína desconocida a partir de la gráfica. (De modo similar, se puede usar un conjunto de proteínas con tiempos de retención en una columna de gel-filtración reproducibles para elaborar una curva estándar de tiempo de retención frente a logM_r. Después se puede comparar el tiempo de retención en la columna de una sustancia desconocida con la curva estándar para obtener una M_r aproximada.)

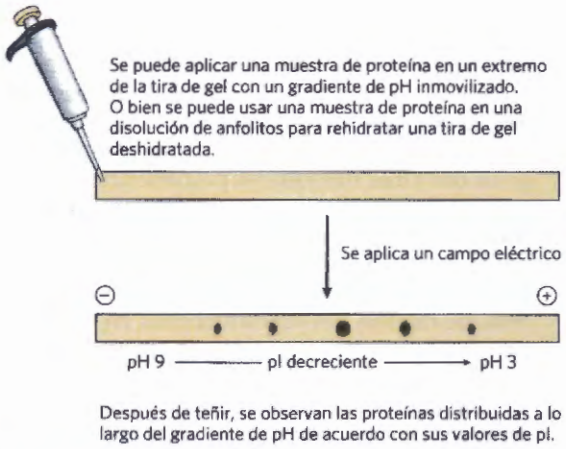


FIGURA 3-20 Enfoque isoeléctrico. Esta técnica separa las proteínas según sus puntos isoeléctricos. Se coloca una mezcla de proteínas sobre una tira de gel que contiene un gradiente de pH inmovilizado. Aplicando un campo eléctrico, las proteínas entran en el gel y se desplazan hasta alcanzar un pH equivalente a su pI. Recuerde que la carga neta de una proteína es cero cuando pH = pI.

vidad enzimática), se determina independientemente la cantidad total de proteína y el cociente de los dos valores da la actividad específica. La actividad y la proteína total generalmente disminuyen en cada paso. La actividad disminuye porque siempre se produce alguna pérdida debido a inactivación o a interacciones no óptimas con los materiales cromatográficos o con otras moléculas de la disolución. La proteína total disminuye porque el objetivo es eliminar tanta proteína no deseada o no específica como sea posible. En un paso de purificación exitoso, la pérdida de proteína no específica es mucho mayor que la pérdida de actividad; por tanto, aun cuando la actividad total disminuye, la actividad específica aumenta. Los datos se recogen finalmente en una tabla de purificación similar a la Tabla 3-5. Generalmente se considera que una proteína es pura cuando pasos adicionales de purificación no consiguen aumentar su actividad específica y cuando sólo se puede detectar una especie proteica (mediante electroforesis, por ejemplo).

En el caso de proteínas que no sean enzimas se requieren otros métodos de cuantificación. Las proteínas de transporte pueden determinarse por su unión a la molécula que transportan, y las hormonas y las toxinas por los efectos biológicos que producen; por ejemplo, las hormonas de crecimiento estimulan el crecimiento de ciertas células en cultivo. Algunas proteínas estructurales representan una fracción tan grande de la masa tisular que pueden extraerse y purificarse fácilmente sin necesidad de un ensayo funcional. Los métodos son tan variados como las propias proteínas.

RESUMEN 3.3 Trabajar con proteínas

■ Las proteínas se separan y purifican en base a diferencias en sus propiedades. Las proteínas se pueden precipitar selectivamente mediante cambios en el pH o en la temperatura y en especial mediante la adición de ciertas sales. Existe una amplia gama de métodos cromatográficos que explota las diferencias de tamaño,

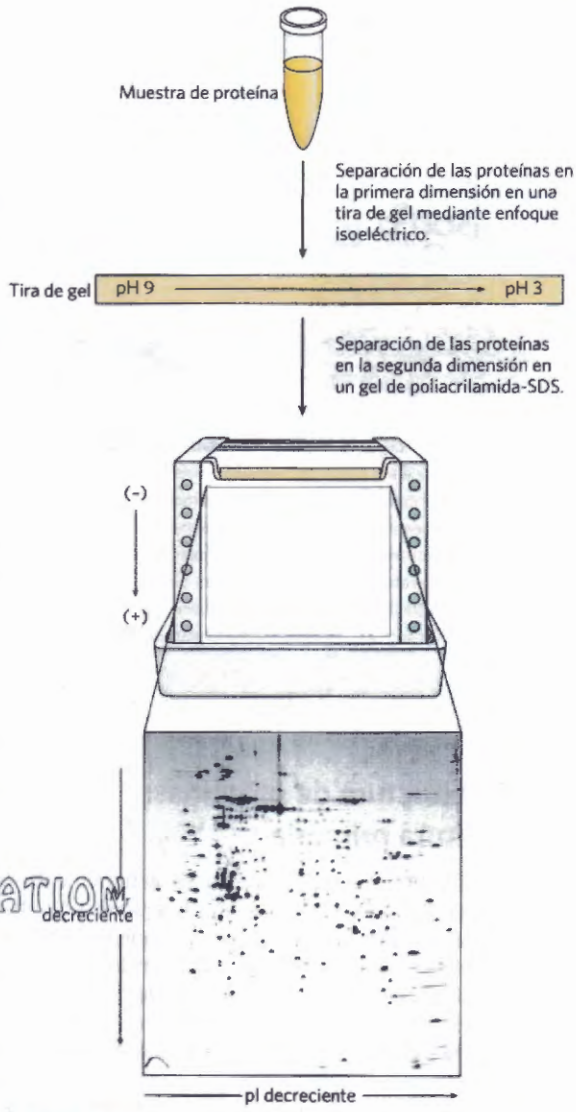


FIGURA 3-21 Electroforesis bidimensional. Las proteínas se separan primero mediante enfoque isoeléctrico en una fina tira de gel. A continuación se extiende el gel horizontalmente sobre un segundo gel, en forma de plancha, y las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La separación horizontal refleja las diferencias de pI; la vertical refleja las diferencias en masa molecular. El conjunto de proteínas se reparte de este modo en las dos dimensiones. Con esta técnica se pueden separar y resolver miles de proteínas. Pueden recortarse del gel las manchas individuales de cada proteína e identificarlas mediante espectrometría de masas (véanse las Figs. 3-30 y 3-31). [Fuente: Cortesía de Axel Mogk, de A. Mogk et al., *EMBO J.* 18:6934, 1999, Fig. 7a.]

afinidad de unión, carga y otras propiedades. Entre estos métodos se incluyen la cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular, de afinidad y la cromatografía líquida de alta resolución.

■ La electroforesis separa proteínas en base a su masa y su carga. La electroforesis en gel con SDS y el enfoque isoeléctrico se pueden utilizar por separado o combinados para obtener una mejor resolución.

■ Todos los procedimientos de purificación requieren un método para cuantificar o distinguir la proteína de interés en presencia de otras proteínas. La purificación



FIGURA 3-22 Actividad frente a actividad específica. Se puede ilustrar la diferencia entre estos dos términos considerando dos recipientes con canicas. Ambos contienen el mismo número de canicas rojas, pero cantidades diferentes de canicas de otros colores. Si se considera que las canicas representan proteínas, ambos recipientes contienen la misma *actividad* de la proteína representada por las canicas rojas. No obstante, el segundo recipiente tiene una *actividad específica* mayor debido a que las canicas rojas son una fracción mucho mayor del total.

puede seguirse mediante el ensayo de la actividad específica.

3.4 Estructura de proteínas: estructura primaria

La purificación de una proteína es generalmente tan solo el preludio de una disección bioquímica detallada de su estructura y función. ¿Qué es lo que hace que una proteína sea un enzima, otra una hormona, otra una proteína estructural y otra un anticuerpo? ¿Cómo se diferencian químicamente? Las diferencias más obvias son estructurales, y es de estructura de proteínas de lo que hablaremos ahora.

La estructura de moléculas grandes como las proteínas puede describirse según varios niveles de complejidad ordenados en una especie de jerarquía conceptual. Normalmente se definen cuatro niveles de estructura de las proteínas **(Fig. 3-23)**. La **estructura primaria** es una descripción de todos los enlaces covalentes (principalmente enlaces peptídicos y puentes disulfuro) que unen los aminoácidos de una cadena polipeptídica. El elemento más importante de la estructura primaria es la *secuencia* de los residuos aminoácidos. La **estructura secundaria** se refiere a disposiciones muy estables de los residuos aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales recurrentes. La **estructura terciaria** describe todos los aspectos del plegamiento tridimensional de un polipéptido. Cuando una proteína posee dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición en el espacio se denomina **estructura cuaternaria**. Nuestra exploración de las proteínas incluirá finalmente las complejas máquinas proteicas compuestas por docenas y hasta miles de subunidades. En lo que resta de capítulo nos concentraremos en la estructura primaria; los niveles superiores de estructura se discuten en el Capítulo 4.

Las diferencias en la estructura primaria pueden ser especialmente informativas. Cada proteína tiene un número y secuencia característicos de residuos aminoácidos. Como veremos en el Capítulo 4, la estructura primaria de una proteína determina la forma en que se pliega en una estructura tridimensional única y ésta, a su vez, determina la función de la proteína. Consideraremos en primer lugar datos empíricos sobre la estrecha relación entre secuencia de aminoácidos y función proteica, para continuar describiendo cómo se determina la secuencia de aminoácidos; finalmente, describiremos los usos que se puede dar a esta información.

La función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos

La bacteria *Escherichia coli* produce más de 3.000 proteínas diferentes; el ser humano tiene unos ~20.000 genes que codifican un número muy superior de proteínas diferentes (mediante procesos genéticos descritos en la Parte III de este libro). En ambos casos, cada tipo de proteína tiene una secuencia de aminoácidos única que le confiere una estructura tridimensional particular. Esta estructura es la que a su vez le confiere una función única.

Algunas observaciones sencillas ilustran la importancia de la estructura primaria, o la secuencia de aminoácidos de una proteína. Primero, tal como ya hemos visto, proteínas con funciones diferentes siempre tienen secuencias de aminoácidos diferentes. En segundo lugar, se han correlacionado miles de enfermedades genéticas humanas con la producción de proteínas defectuosas. El defecto puede ir desde un único cambio en la secuencia de aminoácidos (como en la anemia

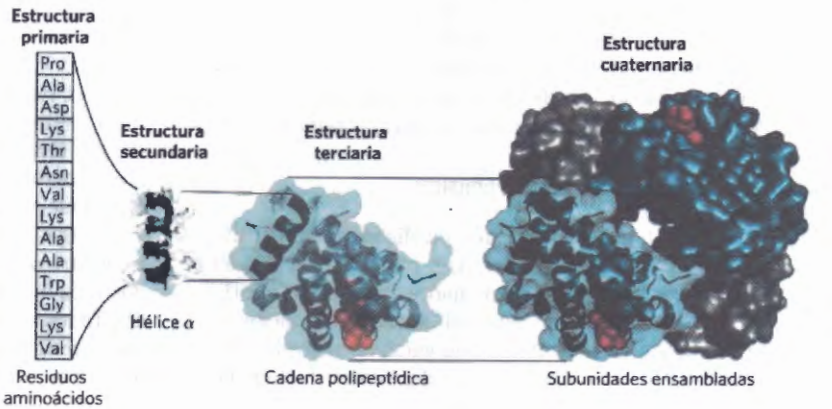


FIGURA 3-23 Niveles de estructura de las proteínas. La *estructura primaria* consiste en una secuencia de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos e incluye los puentes disulfuro que existan. El polipéptido resultante puede estar enrollado en unidades de *estructura secundaria*, tales como una hélice α. La hélice es una parte de la *estructura terciaria* del polipéptido plegado, el cual es en sí mismo una de las subunidades que constituyen la *estructura cuaternaria* de una proteína multisubunidad, en este caso la hemoglobina. [Fuente: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

falciforme, descrita en el Capítulo 5) a la eliminación de una parte mayor de la cadena polipeptídica (como en la mayoría de casos de distrofia muscular de Duchenne: una eliminación de una gran porción del gen que codifica la proteína distrofina da lugar a la producción de una proteína más corta e inactiva). Finalmente, al comparar proteínas con funciones similares de diferentes especies encontramos que estas proteínas tienen a menudo secuencias de aminoácidos similares. Resulta, por tanto, evidente, la íntima relación existente entre la estructura primaria de una proteína y su función..

La secuencia de aminoácidos de una proteína ¿está fijada absolutamente, es decir, es invariable para una proteína concreta? No; es posible cierta flexibilidad. Se calcula que entre el 20 y el 30 % de las proteínas humanas son **polimórficas**, que presentan secuencias de aminoácidos variables entre la población humana. Muchas de estas variaciones de secuencia no tienen ningún efecto, o muy poco, sobre la función de la proteína. Además, proteínas que llevan a cabo una función similar en especies distantes evolutivamente pueden diferir de manera importante en el tamaño global y en la secuencia de aminoácidos.

A pesar de que la secuencia de aminoácidos puede variar considerablemente en algunas regiones de la estructura primaria sin afectar a la función biológica, la mayoría de proteínas contienen regiones cruciales que son esenciales para su función y cuya secuencia se encuentra, por tanto, conservada. Esta fracción de secuencia crítica varía de proteína a proteína, lo que complica la tarea de relacionar secuencia con estructura tridimensional y estructura con función. No obstante, antes de poder profundizar en este problema, hemos de examinar de qué forma se obtiene la información sobre la secuencia.

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de millones de proteínas

Dos importantes descubrimientos que tuvieron lugar en 1953 fueron de importancia crucial en la historia de la bioquímica. En aquel año James D. Watson y Francis Crick dedujeron la estructura en doble hélice del DNA y propusieron la base estructural para explicar su precisa replicación (Capítulo 8). Su propuesta aclaró la realidad molecular que estaba detrás de la idea de gen. En aquel mismo año, Frederick Sanger resolvió la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de la hormona insulina **(Fig. 3-24)**, sorprendiendo a muchos investigadores que habían creído durante mucho tiempo que la determinación de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido sería una tarea sumamente difícil. Muy pronto resultó evidente que la secuencia de nucleótidos del DNA y la secuencia de aminoácidos de las proteínas estaban, de algún modo, relacionadas. Tan solo una década después de estos descubrimientos se había determinado el código genético que relaciona la secuencia nucleotídica del DNA con la secuencia de aminoácidos de las moléculas proteicas (Capítulo 27). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas se obtienen ahora más frecuentemente de manera indirecta a partir de las secuencias de DNA contenidas en bases de datos genómicos. Sin embargo, una serie de técnicas derivadas de los métodos tradicionales de secuenciación de polipéptidos siguen ocupando un lugar importante en la química de proteínas. A continuación resumimos el método tradicional y mencionamos algunas de las técnicas derivadas del mismo.

La química de proteínas se enriquece con métodos derivados de la secuenciación clásica de polipéptidos

Los métodos utilizados en la década de 1950 por Fred Sanger para determinar la secuencia de la proteína insulina se resumen, de manera actualizada, en la **Figura 3-25**. Pocas proteínas se secuencian de esta forma hoy en día, al menos si nos referimos a la totalidad de la secuencia. Como se ha dicho antes, es posible predecir la secuencia de una proteína a partir de la del gen que la codifica, y esta información está disponible en las cada vez más completas bases de datos genómicas. Sin embargo, estos protocolos tradicionales de secuenciación han generado una rica gama de herramientas bioquímicas, y en casi todos los pasos de la Figura 3-25 se emplean métodos que son ampliamente utilizados, a menudo en contextos bien diferentes.



Frederick Sanger, 1918–2013 [Source: UPI/Corbis-Bettmann.]

Según el esquema tradicional de secuenciación de proteínas grandes, se determinaba en primer lugar la identidad del residuo amino-terminal mediante marcaje. El grupo α-amino del extremo amino-terminal puede marcarse con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB), cloruro de dansilo o cloruro de dabsilo **(Fig. 3-26)**.

El proceso de secuenciación químico propiamente dicho se basa en el proceso en dos fases desarrollado por Pehr Edman **(Fig. 3-27)**. El método de la **degradación de Edman**, marca y elimina sólo el residuo amino-terminal de un péptido, dejando el resto de enlaces peptídicos intactos. Se hace reaccionar el péptido con fenilisotiocianato en condiciones alcalinas suaves,

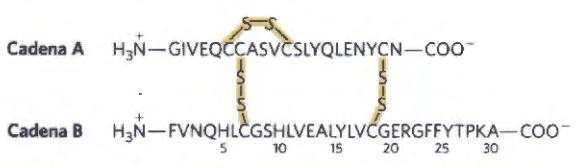


FIGURA 3-24 Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. Las dos cadenas polipeptídicas están unidas por enlaces disulfuro cruzados (en amarillo). La cadena A es idéntica en las insulinas humana, de cerdo, perro, conejo y cachalote. Las cadenas B de la vaca, cerdo, perro, cabra y caballo son idénticas.

lo que convierte el aminoácido amino-terminal en un aducto feniltiocarbamoílo (PTC). El enlace peptídico contiguo al aducto de PTC se rompe a continuación mediante reacción en ácido trifluoroacético anhidro, que conlleva la eliminación del aminoácido amino-terminal en forma de un derivado anilinotiazolinona. El aminoácido modificado se extrae con disolventes orgánicos, se convierte en un derivado más estable, feniltiohidantoína, mediante tratamiento con una disolución acuosa de ácido, y, finalmente, se identifica. El uso de reacciones secuenciales llevadas a cabo primero en condiciones básicas y a continuación en condiciones acídicas proporciona un control sobre todo el proceso. Cada una de las reacciones del aminoácido amino-terminal puede completarse prácticamente en su totalidad sin afectar a ninguno de los demás enlaces del péptido. El proceso se repite hasta, normalmente, la identificación de unos 40 residuos secuenciales de aminoácido. Las reacciones de la degradación de Edman se han automatizado.

Para determinar la secuencia de proteínas grandes, los primeros investigadores que desarrollaron protocolos de secuenciación tuvieron que diseñar métodos para eliminar los enlaces disulfuro y para trocear las proteínas en fragmentos más pequeños de forma precisa. En la **Figura 3-28** se esquematizan dos métodos utilizados para romper enlaces disulfuro de manera irreversible. Los enzimas denominados **proteasas** catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Algunas proteasas cortan solamente los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos específicos (Tabla 3-6) y, por tanto, fragmentan una cadena polipeptídica de forma predecible y reproducible. Varios reactivos químicos también cortan los enlaces peptídicos adyacentes a residuos específicos. Entre las proteasas, el enzima digestivo tripsina cataliza la hidrólisis de tan sólo aquellos enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo está proporcionado por un residuo de Lys o Arg, independientemente de la longitud o secuencia de aminoácidos de la cadena. Un polipéptido con tres residuos de Lys y/o Arg dará lugar normalmente a cuatro péptidos más pequeños al ser cortado por la tripsina. Además, todos excepto uno tendrán una Lys o Arg como carboxilo-terminal. La elección de un reactivo para romper la proteína en péptidos más pequeños puede beneficiarse de la determinación previa de la composición de aminoácidos de la proteína entera tratada con ácido para reducirla a sus aminoácidos constituyentes. La tripsina sólo sería de utilidad en proteínas con un número significativo de residuos Lys o Arg.

En el método clásico de secuenciación se procedería a cortar la proteína dos veces, usando cada vez una proteasa o un reactivo químico diferentes, de manera que los extremos de los fragmentos fueran diferentes.

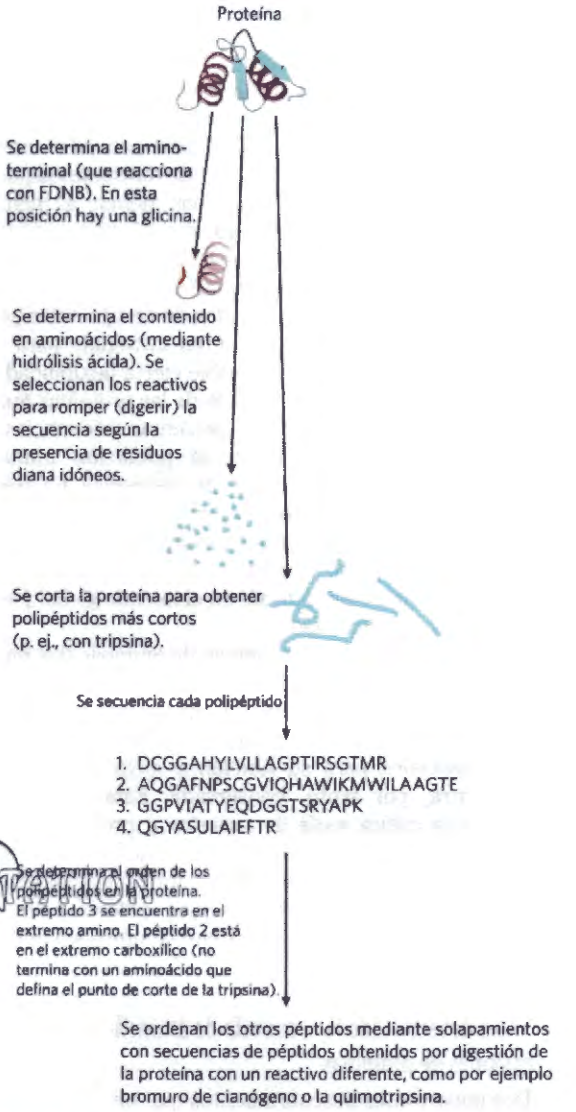


FIGURA 3-25 Secuenciación directa de proteínas. Los procedimientos aquí descritos son los desarrollados por Fred Sanger para secuenciar la insulina, y han sido usados después para múltiples proteínas. (FDNB es 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (véase el texto y la Fig. 3-26).

Se purificarían y secuenciarían ambas colecciones de fragmentos y se podría determinar el orden en que cada fragmento aparece en la proteína original examinando los solapamientos de secuencia entre los dos conjuntos de fragmentos.

Considerando incluso que ya no se utilizan para secuenciar proteínas enteras, los métodos tradicionales de secuenciación son todavía útiles en el laboratorio. La secuenciación de algunos aminoácidos desde el extre-

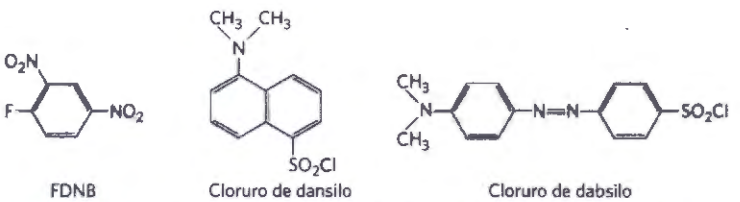


FIGURA 3-26 Reactivos usados para la modificación del grupo a-amino terminal.

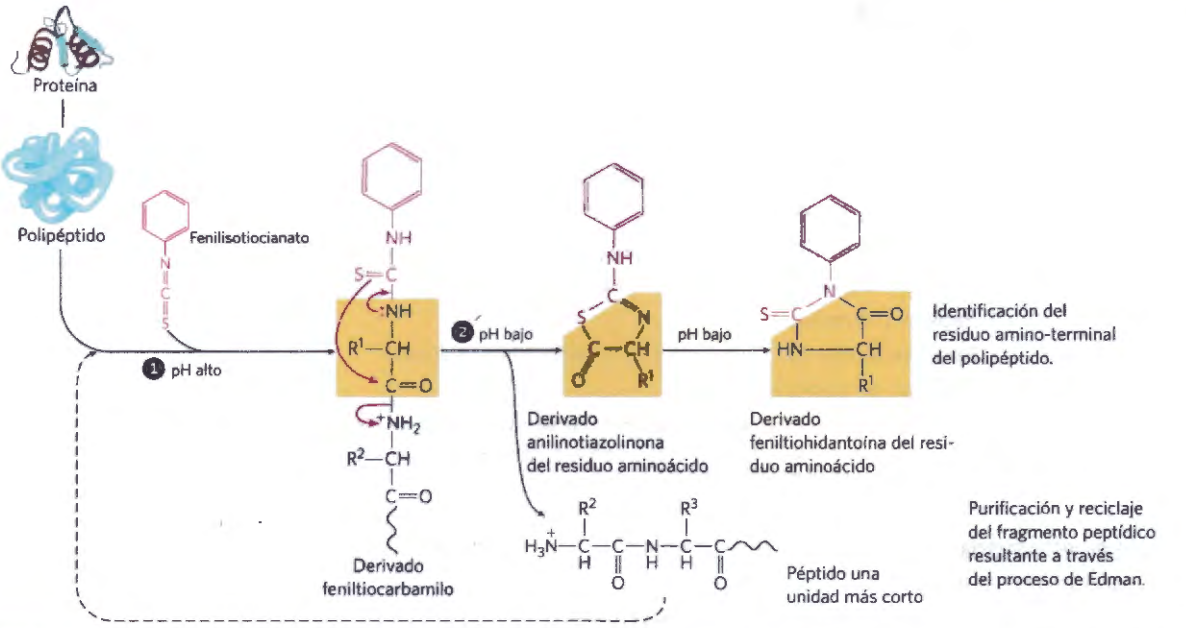


FIGURA 3-27 Química de la secuenciación de proteínas diseñada por Pehr Edman. El enlace peptídico más cercano al amino-terminal de la proteína o el polipéptido se rompe en dos pasos. Los dos pasos se llevan a cabo en condiciones de reacción muy diferentes (básicas en el paso ❶, acídicas en el paso ❷), lo que permite terminar completamente un paso antes de iniciar el siguiente.

mo amino terminal mediante el método de Edman suele ser suficiente para confirmar la identidad de una proteína conocida que se acaba de purificar o para identificar una proteína desconocida que se ha purificado en base a su especial actividad. Algunas técnicas empleadas en pasos concretos del método tradicional de secuenciación sirven también para otros propósitos. Por ejemplo, los métodos usados para romper enlaces disulfuro pueden usarse para desnaturalizar proteínas cuando sea necesario. Además, los esfuerzos hechos para marcar el residuo amino-terminal permitieron el desarrollo de una gama de reactivos capaces de reaccionar con grupos específicos de la proteína. Los reactivos usados para marcar el grupo α-amino terminal pueden ser utilizados para marcar las aminas primarias de los residuos de Lys (Fig. 3-26). El grupo sulfhidrilo de los residuos de Cys puede modificarse con yodoacetamidas, maleimidas, haluros de bencilo y bromometil cetonas **(Fig. 3-29)**. Otros residuos aminoácidos son modificados con reactivos unidos a un colorante o a otro tipo de molécula, lo que permite la detección de proteína o llevar a cabo estudios funcionales.

COPYSTATION

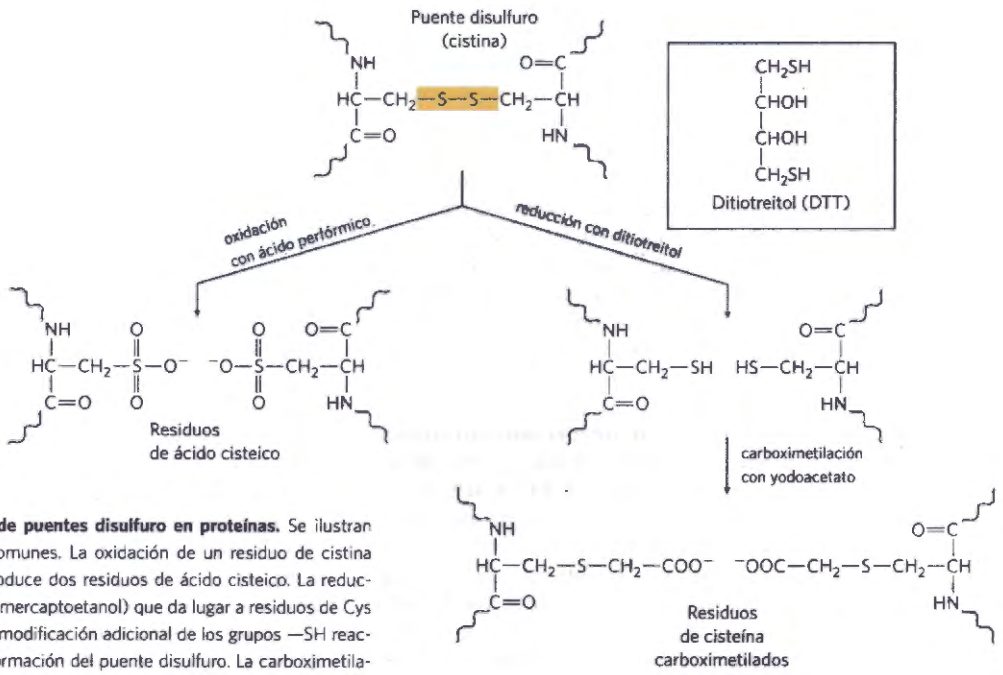


FIGURA 3-28 Rotura de puentes disulfuro en proteínas. Se ilustran los dos métodos más comunes. La oxidación de un residuo de cistina con ácido perfórmico produce dos residuos de ácido cisteico. La reducción con ditiotreitol (o β-mercaptoetanol) que da lugar a residuos de Cys ha de continuar con una modificación adicional de los grupos —SH reactivos para impedir la reformación del puente disulfuro. La carboximetilación con yodoacetato es útil en este último caso.

TABLA 3-6 Especificidad de algunos métodos usuales de fragmentación de cadenas polipeptídicas

Reactivo (fuente biológica)[a]	Puntos de corte[b]
Tripsina (páncreas bovino)	Lys, Arg (C)
Proteasa submaxilar (glándula submaxilar de ratón)	Arg (C)
Quimotripsina (páncreas bovino)	Phe, Trp, Tyr (C)
Proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (bacteria *S. aureus*)	Asp, Glu (C)
Proteasa Asp-*N* (bacteria Pseudomonas fragi)	Asp, Glu (N)
Pepsina (estómago porcino)	Leu, Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinasa Lys C (bacteria Lysobacter enzymogenes)	Lys (C)
Bromuro de cianógeno	Met (C)

[a]A excepción del bromuro de cianógeno son todos proteasas. Todos pueden obtenerse comercialmente.

[b]Residuos que aportan el punto de reconocimiento primario para la proteasa o el reactivo; la rotura del enlace peptídico tiene lugar en el lado carbonilo (C) o amino (N) del residuo aminoácido indicado.

La espectrometría de masas es un método alternativo para determinar secuencias de aminoácidos

Las adaptaciones modernas de la **espectrometría de masas** constituyen una importante alternativa a los métodos de secuenciación descritos anteriormente. La espectrometría de masas proporciona una medida muy exacta de la masa molecular de una proteína, pero puede hacer mucho más. En concreto, diversas variantes de la espectrometría de masas permiten obtener muy rápidamente las secuencias de múltiples fragmentos polipeptídicos cortos (de 20 a 30 aminoácidos) procedentes de una muestra de proteína.

El espectrómetro de masas ha sido desde hace tiempo una herramienta indispensable en química. Las moléculas a analizar, a las que nos referimos como **analitos**, se ionizan en primer lugar en el vacío. Cuando las moléculas recién cargadas se introducen en un campo eléctrico y/o magnético, sus trayectorias a través del campo son función de su relación masa-carga, m/z. La medición de esta propiedad de las especies ionizadas puede utilizarse para deducir la masa (m) del analito con una precisión muy elevada.

Aunque la espectrometría de masas ha venido utilizándose durante muchos años, no podía aplicarse a macromoléculas tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Las medidas de m/z se realizan sobre moléculas en fase gaseosa, y el calentamiento u otros tratamientos necesarios para llevar una macromolécula a la fase gaseosa causaban normalmente su rápida descomposición. En 1988, se desarrollaron dos técnicas diferentes para superar este problema. En una de ellas, las proteínas se colocan dentro de una matriz capaz de absorber luz. Con un pulso corto de luz láser, las proteínas se ionizan y a continuación se desorben de la matriz hacia el sistema de vacío. Este proceso, conocido como **espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ ionization*)** o **MALDI MS**, se ha utilizado con éxito para medir la masa de una gran variedad de macromoléculas. En un segundo proceso, que también da muy buenos resultados, se fuerza a macromoléculas en disolución a pasar de la fase líquida a la fase gaseosa directamente. Se hace pasar una disolución de analitos a través de una aguja cargada que se mantiene a un elevado potencial eléctrico, con la consiguiente dispersión de la disolución en una fina niebla de microgotas cargadas. El disolvente que rodea las macromoléculas se evapora rápidamente, dejando iones macromoleculares con múltiples cargas en la fase gaseosa. Esta técnica se denomina **espectrometría de masas de ionización por electro-spray (electrospray ionization mass spectrometry)**, o **ESI MS**. Los protones añadidos durante el paso a través de la aguja proporcionan carga adicional a la macromolécula. La m/z de la molécula puede analizarse en la cámara de vacío.

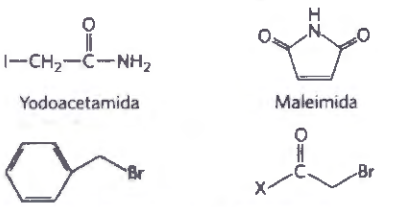


FIGURA 3-29 Reactivos usados para modificar grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína. (Véase también la Fig. 3-28.)

COPY-STATION

La espectrometría de masas proporciona una gran cantidad de información para la investigación en proteómica, enzimología y química de proteínas en general. Las técnicas requieren solamente cantidades minúsculas de muestra, de forma que pueden aplicarse fácilmente a las pequeñas cantidades de proteína que pueden extraerse de un gel electroforético bidimensional. La determinación precisa de la masa molecular de una proteína es uno de los parámetros críticos para su identificación. Una vez que se conoce con precisión la masa de una proteína, la espectrometría de masas es un método práctico y preciso para detectar cambios de masa debidos a la presencia de cofactores unidos, iones metálicos unidos, modificaciones covalentes, etc.

El proceso para determinar la masa molecular de una proteína mediante ESI-MS se ilustra en la **Figura 3-30**. Al ser inyectada en la fase gaseosa, una proteína adquiere un número variable de protones y, por tanto, de cargas positivas, del disolvente. La adición variable de estas cargas genera un espectro de especies con

diferentes relaciones masa-carga. Cada pico sucesivo corresponde a una especie que difiere del pico contiguo por una diferencia de carga de 1 y una diferencia de masa de 1 (1 protón). La masa de la proteína puede determinarse a partir de cualquier par de picos contiguos.

La espectrometría de masas puede utilizarse también para secuenciar segmentos cortos de un polipéptido, una aplicación que se ha establecido como una herramienta muy valiosa para la identificación rápida de proteínas desconocidas. La información secuencial se obtiene utilizando una técnica denominada **MS en tándem**, o **MS/MS**. Una disolución que contiene la proteína que se está investigando se trata en primer lugar con una proteasa o un reactivo químico para hidrolizarla a una mezcla de péptidos más cortos. La mezcla se inyecta entonces en un dispositivo que consiste esencialmente en dos espectrómetros de masas en tándem (**Fig. 3-31a**, arriba). En el primero de ellos se separa la mezcla de péptidos de forma que sólo uno de los diversos tipos de péptidos producidos por la fragmentación sale por el otro extremo. La muestra del péptido seleccionado, todas las moléculas del cual tienen carga en algún punto de su secuencia, viaja entonces a través de una cámara de vacío entre los dos espectrómetros de masas. En esta cámara de colisión, el péptido vuelve a fragmentarse por impactos de elevada energía con un "gas de colisión", como por ejemplo helio o argón, que se inyecta en la cámara de vacío. En promedio cada péptido individual se rompe en un solo sitio. A pesar de que las roturas no son hidrolíticas, la mayoría de ellas tienen lugar en el enlace peptídico.

El segundo espectrómetro de masas mide entonces las relaciones *m/z* de todos los fragmentos cargados. Este proceso genera uno o más conjuntos de picos. Un determinado conjunto de picos (Fig. 3-31b) contiene todos los fragmentos cargados que se han generado mediante la rotura del mismo tipo de enlace (pero en puntos diferentes del péptido). Uno de los conjuntos de picos sólo contiene los fragmentos en los que la carga se retiene en el lado amino-terminal de los enlaces rotos; otro conjunto sólo contiene los fragmentos en los que la carga se retiene en el lado carboxilo-terminal de los enlaces rotos. Cada pico sucesivo en un conjunto determinado tiene un aminoácido menos que el pico anterior. La diferencia de masa de pico a pico identifica el aminoácido que se ha perdido en cada caso, revelando así la secuencia del péptido. Las únicas ambigüedades implican la leucina y la isoleucina, que tienen la misma masa. A pesar de que generalmente se generan múltiples conjuntos de picos, los dos más importantes contienen los fragmentos derivados de la rotura del enlace peptídico. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de uno de los conjuntos puede confirmarse con el otro, lo que mejora la fiabilidad de la información secuencial obtenida.

Los diversos métodos utilizados para obtener información sobre la secuencia proteica se complementan. El procedimiento de degradación de Edman sirve, a veces, para obtener información secuencial sólo del extremo amino-terminal. Sin embargo, es relativamente lento y requiere mayor cantidad de muestra que la espectrometría de masas. Esta última se usa cuando se dispone de cantidades pequeñas de muestra o con

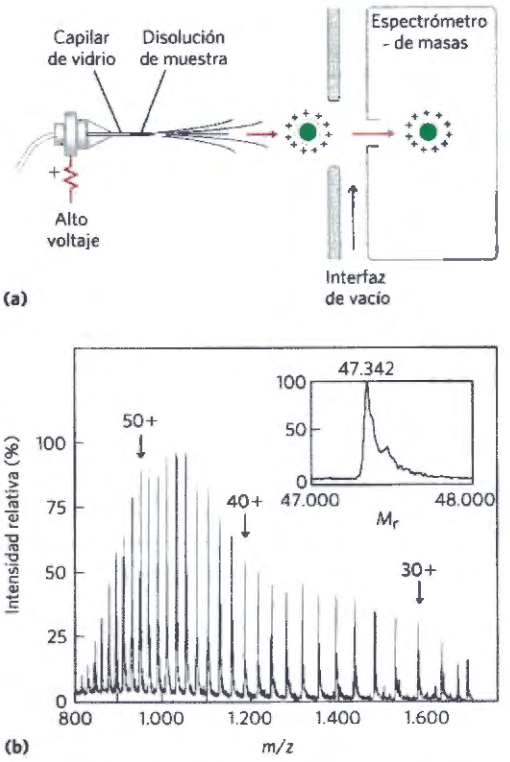
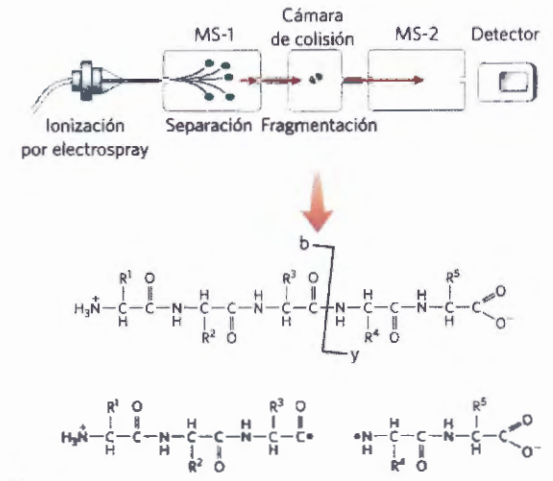
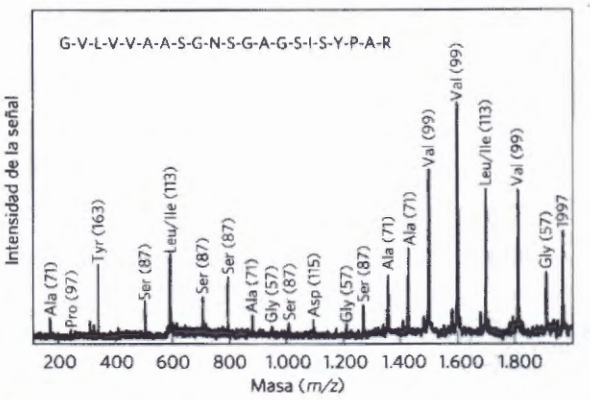


FIGURA 3-30 Espectro de masas por electrospray de una proteína. **(a)** Una disolución de proteína se dispersa en microgotas fuertemente cargadas mediante el paso a través de una aguja bajo la influencia de un campo eléctrico de alto voltaje. Las microgotas se evaporan y los iones (en este caso con protones adicionados) entran en el espectrómetro de masas donde se mide su *m/z*. El espectro generado **(b)** es una familia de picos, en la que cada pico sucesivo (de derecha a izquierda) corresponde a una especie cargada con 1 unidad más tanto de masa como de carga. En el inserto se muestra una transformación de este espectro generada por ordenador. [Fuente: Información de M. Mann y M. Wilm, *Trends Biochem Sci.* 20:219, 1995.]

muestras no puras. Proporciona información secuencial, pero los procesos de fragmentación pueden generar huecos impredecibles en la secuencia. A pesar de que la mayoría de secuencias de proteínas se extraen actualmente de las secuencias de DNA genómico (Capítulo 9) gracias a nuestro conocimiento del código genético (Capítulo 27), la secuenciación directa de la proteína es a veces necesaria para identificar muestras desconocidas. Los dos métodos de secuenciación permiten la identificación inequívoca de proteínas recién purificadas. La espectrometría de masas es el método de elección para identificar proteínas presenten en cantidades muy pequeñas. La técnica es, por ejemplo, lo suficientemente sensible como para analizar los pocos centenares de nanogramos de proteína que pueden extraerse de una banda única en un gel de poliacrilamida. La secuenciación directa mediante espectrometría de masas permite también deducir la adición de grupos fosforilo y otros tipos de modificaciones (Capítulo 6). La secuenciación por cualquiera de los dos métodos puede desvelar cambios en la secuencia proteica que sean producto de la modificación del RNA mensajero en eucariotas (Capítulo 26). Por tanto, estos métodos forman parte de un sólido grupo de herramientas que se usa en la investigación sobre las proteínas y sus funciones.



(a)



(b)

FIGURA 3-31 Obtención de información secuencial de una proteína por espectrometría de masas en tándem. (a) Tras hidrólisis proteolítica, se inyecta una disolución de proteína en un espectrómetro de masas (MS-1). Los diferentes péptidos se separan de manera que sólo se selecciona uno para su análisis posterior. El péptido seleccionado se fragmenta de nuevo en una cámara entre los dos espectrómetros de masas, y se mide *m/z* para cada fragmento en el segundo espectrómetro de masas (MS-2). Muchos de los iones generados durante esta segunda fragmentación resultan de la rotura del enlace peptídico, en la forma mostrada. Estos iones se denominan iones tipo b o iones tipo y, según si la carga se mantiene en el lado amino o carboxilo-terminal, respectivamente. **(b)** Un espectro típico con picos que representan los fragmentos peptídicos generados a partir de una muestra de un péptido pequeño (21 residuos). Los picos marcados son iones tipo y derivados de residuos aminoácidos. El número entre paréntesis encima de cada pico es la masa molecular del ion del aminoácido. Los picos sucesivos difieren en la masa de un aminoácido determinado del péptido original. La secuencia deducida se muestra en la parte superior. [Fuente: Información de T. Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7131, 1999, Fig. 3.]

Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas

Muchos péptidos son potencialmente útiles como agentes farmacológicos por lo que su producción es de considerable importancia comercial. Existen tres manera de obtener un péptido: (1) por purificación a partir del tejido, tarea a menudo dificultada por las concentraciones extremadamente pequeñas de algunos péptidos; (2) mediante ingeniería genética (Capítulo 9); o (3) por síntesis química directa. Gracias al desarrollo de técnicas poderosas, la síntesis química directa es actualmente una opción atractiva en muchos casos. Además de las aplicaciones comerciales, la síntesis de péptidos específicos provenientes de proteínas más grandes constituye una herramienta cada vez más importante para el estudio de la estructura y función de proteínas.

La complejidad de las proteínas hace que las estrategias sintéticas tradicionales de la química orgánica no sean prácticas para péptidos de más de cuatro o cinco aminoácidos. Uno de los problemas es la dificultad de purificar el producto después de cada paso.

El principal avance en esta tecnología fue protagonizado por R. Bruce Merrifield en 1962. Su innovación consistía en que la síntesis del péptido se llevaba a cabo manteniéndolo unido por un extremo a un soporte sólido. El soporte es un polímero insoluble (resina) contenido dentro de una columna, similar a las utilizadas en los procedimientos cromatográficos. El péptido se construye sobre este soporte, adicionando aminoácido a aminoácido y utilizando un conjunto estándar de reacciones que siguen un ciclo repetitivo **(Fig. 3-32)**. En cada paso sucesivo del ciclo, grupos químicos protectores bloquean las reacciones no deseadas.

En la actualidad, la tecnología para la síntesis química de péptidos se ha automatizado. Una importante limitación del proceso (compartida con el proceso de secuenciación por degradación de Edman) estriba en la eficiencia de cada ciclo químico, tal como puede verse al calcular los rendimientos globales de péptidos de diferentes longitudes cuando el rendimiento por adición de cada nuevo aminoácido es de 96,0% en lugar de 99,8% (Tabla 3-7). La reacción incompleta en un paso puede llevar a la formación de una impureza (en forma de un péptido más corto) en el siguiente. Los procedimientos químicos se han optimizado hasta permitir la síntesis de proteínas de una longitud de 100 aminoácidos en unos pocos días con un rendimiento razonable. Se utiliza un enfoque muy similar en la síntesis de ácidos nucleicos (véase la Fig. 8-33). Merece la pena resaltar que esta tecnología, aun siendo impresionante, empalidece al compararla con los procesos biológicos. La misma proteína de 100 aminoácidos sería sintetizada con una fidelidad exquisita en unos 5 segundos por una célula bacteriana.

Diversos métodos modernos para la eficiente ligación (unión) de péptidos han hecho posible la combinación de péptidos sintéticos para formar polipéptidos y proteínas mayores. Con estos métodos pueden crearse formas nuevas de proteínas que contengan grupos químicos posicionados según un diseño cuidadoso, incluyendo aquellos que pueden no encontrarse normalmente en las proteínas celulares. Estas nuevas formas proporcionan maneras diferentes de comprobar teorías sobre catálisis enzimática, de crear proteínas con nuevas propiedades químicas, y de diseñar secuencias proteicas que se plieguen en determinadas estructuras. Esta última aplicación proporciona el test definitivo para nuestra creciente capacidad de relacionar la estructura primaria de un péptido con la estructura tridimensional que adopta en disolución.

La secuencia de aminoácidos proporciona información bioquímica importante

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de una proteína puede proporcionar datos acerca de su estructura tridimensional y función, su localización celular y su evolución. Gran parte de estas deducciones provienen de la búsqueda de similitudes entre una proteína de interés y otras de secuencia conocida. Se conocen miles de secuencias que están disponibles en bancos de datos accesibles a través de Internet. La comparación de una secuencia recién obtenida con el amplio banco de secuencias almacenadas revela, a menudo, relaciones que pueden ser a la vez sorprendentes e iluminadoras.

No se conoce con detalle el modo en que la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional, ni puede predecirse siempre la función a partir de la secuencia. Sin embargo, existen familias de proteínas que tienen algunas características estructurales o funcionales compartidas que pueden identificarse rápidamente sobre la base de la similitud de las secuencias de aminoácidos. Las proteínas individuales se asignan a las diferentes familias en función del grado de similitud de su secuencia de aminoácidos. Los miembros de una familia son generalmente idénticos en un 25% o más de sus

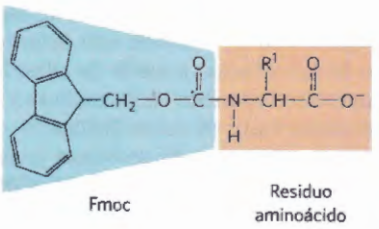
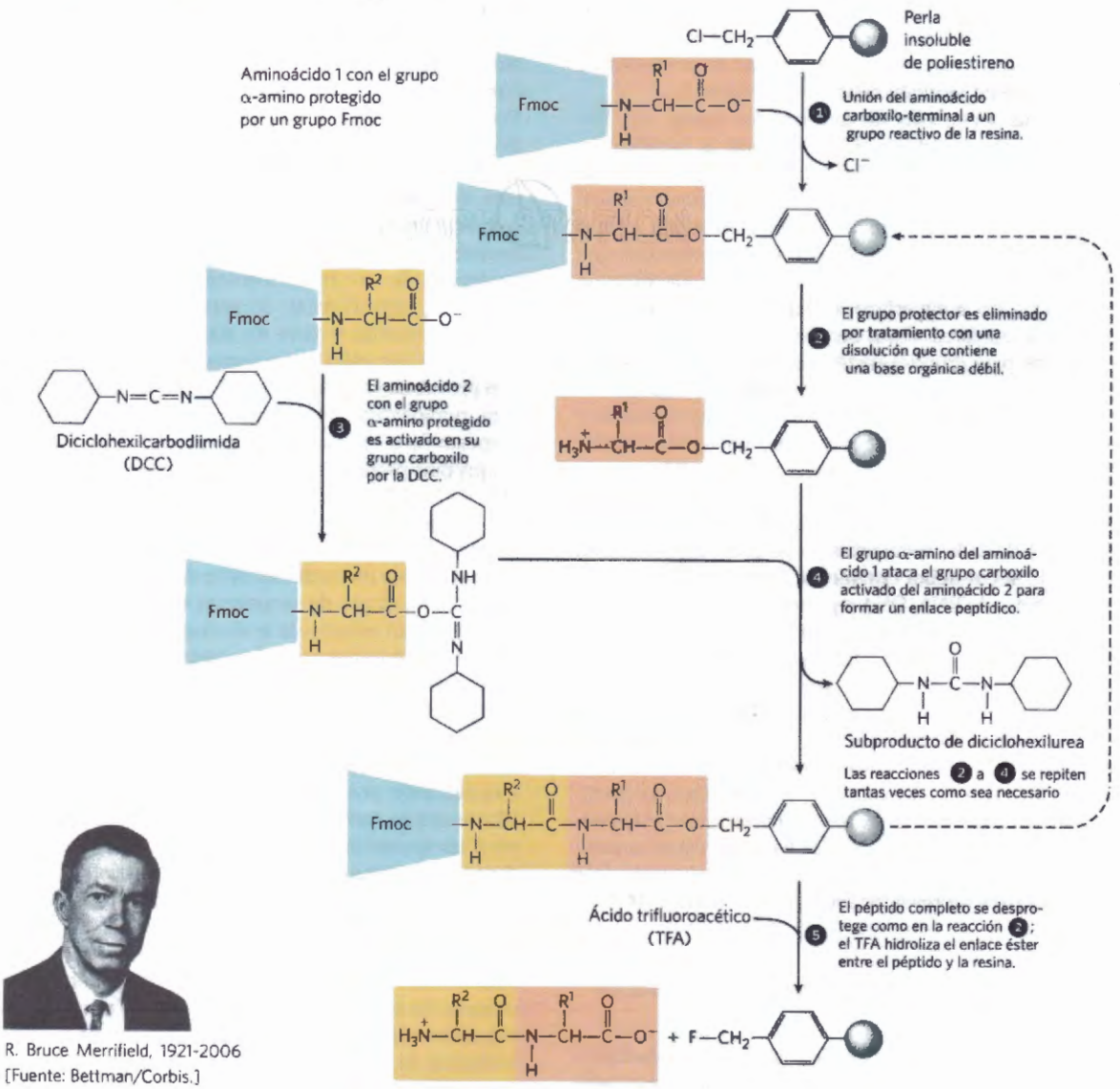


FIGURA 3-32 Síntesis química de un péptido sobre un soporte polimérico insoluble. Las reacciones ❶ a ❹ son necesarias para la formación de cada enlace peptídico. El grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (sombreado en azul), impide reacciones no deseadas del grupo α-amino del residuo (sombreado en rojo claro). La síntesis química transcurre desde el extremo carboxilo-terminal al extremo amino-terminal, la dirección inversa a la dirección de la síntesis proteica in vivo (Capítulo 27).



R. Bruce Merrifield, 1921-2006
[Fuente: Bettman/Corbis.]

TABLA 3-7 Efecto del rendimiento de cada paso sobre el rendimiento global en la síntesis de péptidos

Número de residuos en el polipéptido final	Rendimiento global del péptido final (%) cuando el rendimiento de cada paso es: 96,0%	99,8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94

secuencias, y las proteínas de estas familias suelen compartir, al menos, algunas características estructurales y funcionales. No obstante, algunas familias se definen por identidades que afectan solamente a un pequeño número de residuos aminoácidos que son críticos para alguna función determinada. Diversas subestructuras similares o "dominios" (que se definirán con mayor precisión en el Capítulo 4) se hallan presentes en muchas proteínas no relacionadas funcionalmente. Estos dominios se pliegan a menudo dando configuraciones estructurales que tienen un grado de estabilidad excepcional o que están especializadas para cierto entorno. De las similitudes estructurales y funcionales dentro de las familias de proteínas es posible deducir también relaciones evolutivas.

Ciertas secuencias de aminoácidos sirven con frecuencia como señales que determinan la localización celular, la modificación química y la vida media de una proteína. Secuencias señal especiales, situadas normalmente en el extremo amino, sirven para dirigir ciertas proteínas hacia la exportación extracelular, mientras que otras proteínas contienen marcas para su distribución hacia el núcleo, la superficie celular, el citosol u otras localizaciones celulares. Otras secuencias actúan como sitio de anclaje para grupos prostéticos, tales como los grupos azúcar de las glucoproteínas y los lípidos de las lipoproteínas. Algunas de estas señales están bien caracterizadas y son reconocidas fácilmente si se presentan en la secuencia de una proteína recién descubierta (Capítulo 27).

›› **Convención Clave:** Gran parte de la información funcional encapsulada en las secuencias proteicas se presenta en la forma de **secuencias consenso**. Este término se aplica a secuencias de RNA, DNA o proteína. Cuando se compara una serie de secuencias de ácido nucleico o de proteína relacionadas, la secuencia consenso es la que contiene la base o el aminoácido más frecuente en cada posición. Aquellas partes de la secuencia en las que se observa una coincidencia particularmente elevada suelen representar dominios funcionales conservados evolutivamente. Se puede usar una amplia gama de herramientas matemáticas disponible en Internet para generar secuencias consenso o para identificarlas en las bases de datos secuenciales. El Recuadro 3-2 ilustra las convenciones más comunes para representar secuencias consenso. ‹‹

Las secuencias de proteínas permiten deducir la historia de la vida en la Tierra

La simple cadena de letras con la que se simboliza la secuencia de aminoácidos de una proteína contiene una sorprendente cantidad de información. Al incrementarse el número de secuencias proteicas disponibles, uno de los principales empeños de los bioquímicos ha sido el desarrollo de métodos más potentes para la extracción de información a partir de ellas. El análisis de la información disponible en las muchas y continuamente crecientes bases de datos biológicos, que incluyen secuencias génicas y de proteínas y estructuras macromoleculares, ha dado lugar a la aparición del nuevo campo de la **bioinformática**. Uno de los productos de esta disciplina es el creciente número de programas informáticos, muchos de ellos disponibles fácilmente en Internet, que pueden ser utilizados por cualquier científico, estudiante o persona interesada. Toda función proteica reside en su estructura tridimensional que, a su vez, viene determinada principalmente por su estructura primaria. De este modo, la información bioquímica deducible de una secuencia proteica sólo está limitada por nuestro grado de comprensión de los principios estructurales y funcionales. La constante evolución de las herramientas bioinformáticas hace posible la identificación de segmentos funcionales en nuevas proteínas y sirve de soporte para el establecimiento de sus relaciones secuenciales y estructurales con proteínas ya presentes en las bases de datos. Desde otra perspectiva, las secuencias de proteínas están empezando a aportar datos acerca de la evolución de las propias proteínas y, en último término, de la evolución de la vida en el planeta.

La paternidad del campo de la evolución molecular se suele adjudicar a Emile Zuckerkandl y Linus Pauling, cuyos trabajos de mediados de la década de 1960 fueron pioneros en el uso de secuencias de nucleótidos y proteínas para el estudio de la evolución. El punto de partida es engañosamente claro y simple: si dos organismos están estrechamente relacionados, las secuencias de sus genes y proteínas serán muy similares. Las secuencias son cada vez más divergentes al aumentar la distancia evolutiva entre dos organismos. Este punto de vista empezó a dar sus frutos en los años 1970, cuando Carl Woese utilizó secuencias de RNA ribosómico para definir a las arqueobacterias como un grupo de organismos distintos de otras bacterias y de los eucariotas (véase la Fig. 1-5). Las secuencias de proteínas ofrecen la oportunidad de refinar en profundidad la información disponible. Gracias a los proyectos genoma que investigan organismos que van desde bacterias a humanos, el número de secuencias disponibles crece a una enorme velocidad. Esta información sirve para seguir la historia biológica. El reto consiste en aprender a leer el jeroglífico genético.

RECUADRO 3-2 Secuencias consenso y logotipos de secuencia

Las secuencias consenso se pueden representar de diferentes maneras. Usaremos los dos ejemplos de secuencias consenso mostradas en la Figura 1 para mostrar dos tipos de convenciones: (a) una estructura de unión a ATP llamada lazo P (véase el Recuadro 12-2) y (b) una estructura de unión a Ca^{2+} llamada mano EF (véase la Fig. 12-12). Las reglas descritas aquí están adaptadas a partir de las utilizadas en la página web de comparación de secuencias PROSITE (http://prosite.expasy.org/sequence_logo.html), que usan el código de una letra para los aminoácidos.

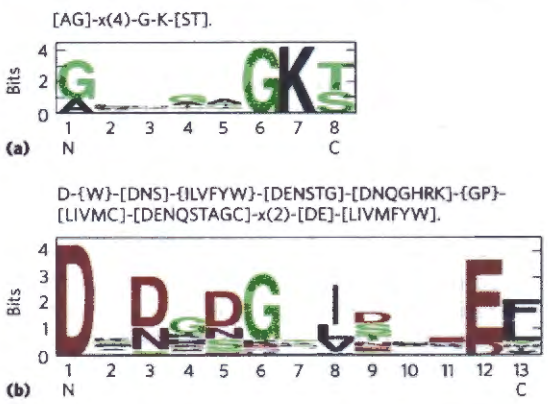


FIGURA 1 Representación de dos secuencias consenso. (a) Lazo P, una estructura de unión a ATP; (b) mano EF, una estructura de unión a Ca^{2+}. [Fuentes: Datos secuenciales de los documentos (a) ID PDOC00017 y (b) ID PDOC00018, www.expasy.org.prosite, N. Hulo et al., *Nucleic Acids Res.* 34:D227, 2006. Los logotipos de secuencia fueron creados con Weblogo, http://weblogo.berkeley.edu, G.E. Crooks et al., *Genome Res.* 14:1188, 2004.]

En una de las maneras de describir secuencias consenso (mostrada en la parte superior de (a) y (b)), cada posición se separa de la siguiente mediante un guion. Se escribe una x allí donde cualquier aminoácido es posible. Las ambigüedades se indican listando los aminoácidos aceptables en una posición determinada entre corchetes. Por ejemplo, en (a) [AG] significa Ala o Gly. Si en una posición se permiten todos los aminoácidos excepto unos cuantos, aquellos *no* permitidos se listan entre llaves. Por ejemplo, en (b) {W} significa cualquier aminoácido excepto Trp. La repetición de un elemento de la secuencia se indica escribiendo a continuación de su símbolo el número de repeticiones o su rango entre paréntesis. Por ejemplo, en (a) x(4) indica x-x-x-x, y x(2,4) indica x-x, x-x-x o x-x-x-x. Cuando una pauta se restringe a los extremos amino o carboxilo de la secuencia, la pauta empieza con < o termina con >, respectivamente (esto no ocurre en los ejemplos aquí mostrados). Un punto indica el final. Aplicando estas reglas a la secuencia consenso de (a), A o G pueden hallarse en la primera posición. Las cuatro posiciones siguientes pueden ser ocupadas por cualquier aminoácido, seguidas por las posiciones invariantes G y K. La última posición es S o T.

Los logotipos de secuencia proporcionan una representación más informativa y gráfica de los alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos (o de ácidos nucleicos). Cada logotipo consiste en un apilamiento de símbolos para cada posición de la secuencia. La altura del apilamiento (en bits) indica el grado de conservación de la secuencia en esta posición, mientras que la altura de cada uno de los símbolos en la pilas indica la frecuencia relativa de aquel aminoácido (o nucleótido). En el caso de las secuencias de aminoácidos, los colores denotan sus características: polares (G, S, T, Y, C, Q, N) en verde; básicos (K, R, H) en azul; acídicos (D, E) en rojo; e hidrofóbicos (A, V, L, I, P, W, F, M) en negro. La clasificación de los aminoácidos en este esquema es ligeramente diferente de los de la Tabla 3-1 y la Figura 3-5. Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas están incluidos en los grupos de los no polares (F, W) y polares (Y). La glicina, siempre difícil de clasificar, se considera polar. Observe que cuando en una posición puede haber múltiples aminoácidos, raramente aparecen con igual probabilidad y generalmente predominan uno o unos pocos. La representación logotípica clarifica este predominio y la secuencia conservada queda clara. Sin embargo, algunos aminoácidos que pueden estar presentes en una posición quedan oscurecidos, como es el caso de la Cys que puede aparecer en la posición 8 de la mano EF en (b).

La evolución no ha tomado un camino simple y lineal. Cualquier intento de extraer la información evolutiva contenida en secuencias de proteínas está cuajado de complejidades. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad de una determinada proteína se conservan a lo largo del tiempo evolutivo. Aquellos residuos menos importantes para la función pueden sufrir ciertas variaciones durante la historia, es decir, puede haber sustituciones de aminoácidos, y estas variaciones pueden proporcionar la información necesaria para trazar el camino evolutivo. Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos no se producen siempre al azar. En ciertas posiciones de la estructura primaria, la necesidad de mantener la función puede implicar que tan solo sean tolerables algunas sustituciones de aminoácidos concretas. Algunas proteínas tienen un número mayor de residuos aminoácidos variables que otras. Por esta y otras razones, proteínas diferentes pueden evolucionar a velocidades distintas.

Otro factor que complica la deducción de la historia evolutiva es la poco frecuente transferencia de un gen o grupo de genes de un organismo a otro, según un proceso que se denomina **transferencia génica lateral**. Los genes transferidos pueden ser muy similares a los genes de los que derivaron en los organismos de partida, mientras que la mayor parte del resto de genes de los dos organismos pueden tener relaciones evolutivas muy distantes. Un ejemplo de transferencia génica late-

ral se encuentra en la reciente rápida extensión de genes de resistencia a los antibióticos entre las poblaciones bacterianas. Las proteínas derivadas de estos genes transferidos no serían buenos candidatos para el estudio de la evolución bacteriana porque solo comparten una historia evolutiva muy limitada con sus organismos "huésped".

El estudio de la evolución molecular suele centrarse generalmente en familias de proteínas estrechamente relacionadas. En la mayoría de los casos, las familias escogidas tienen funciones esenciales en el metabolismo celular que han debido estar presentes en la células viables más primitivas, reduciendo de este modo la posibilidad de que hubieran sido introducidas recientemente por transferencia génica lateral. Por ejemplo, una proteína denominada EF-1α (factor de elongación 1α) está implicada en la síntesis de proteínas en todos los eucariotas. En bacterias se encuentra otra proteína similar, EF-Tu, con la misma función. Las similitudes en secuencia y función indican que EF-1α y EF-Tu son miembros de una familia de proteínas que comparten un ancestro común. Los miembros de las familias de proteínas son **proteínas homólogas** u **homólogos**. Se puede refinar más el concepto de homólogo. Si dos proteínas de una misma familia (es decir, dos homólogos) se encuentran en la misma especie, nos referimos a ellos como **parálogos**. Los homólogos de especies diferentes se denominan **ortólogos**. El proceso de reconstrucción de la evolución implica la previa identificación de familias adecuadas de proteínas homólogas para usarlas a continuación en la reconstrucción de los caminos evolutivos.

Los homólogos se identifican utilizando programas de ordenador cada vez más potentes que son capaces de comparar directamente dos o más secuencias seleccionadas o de buscar en voluminosas bases de datos para encontrar parientes evolutivos de una secuencia seleccionada. El proceso de búsqueda electrónica puede imaginarse como el deslizamiento de una secuencia sobre otra mucha hasta que se encuentra el mejor apareamiento. En el alineamiento secuencial se asigna un valor positivo a cada posición en la que los residuos aminoácidos son idénticos, valores que varían de un programa a otro, lo que proporciona una medida de la calidad del alineamiento. El procedimiento no está exento de complicaciones. En algunos casos las proteínas comparadas se aparean bien, por ejemplo, en dos segmentos secuenciales, mientras que estos segmentos están conectados por secuencias menos relacionadas y de longitudes diferentes. Por tanto, los dos segmentos coincidentes no pueden ser alineados al mismo tiempo. Para salvar este obstáculo, el programa informático introduce "huecos" en una de las secuencias para volver a colocar los segmentos apareables en registro **(Fig. 3-33)**. Naturalmente, todos los posibles pares de secuencias podrían ser alineados prácticamente de alguna forma si se introdujera un número de huecos suficiente. Para evitar alineamientos no informativos, los programas incluyen penalizaciones para cada hueco introducido, lo que hace disminuir el valor o la puntuación del alineamiento global. A través de un proceso de prueba y error electrónico el programa selecciona el alineamiento con la puntuación óptima que maximiza el número de aminoácidos idénticos al tiempo que minimiza la introducción de huecos.

La observación de aminoácidos idénticos resulta a menudo inadecuada para la identificación de proteínas relacionadas o, lo que es más importante, para determinar la proximidad de las proteínas en una escala de tiempo evolutiva. La consideración de las propiedades químicas de los aminoácidos sustituidos permite establecer un análisis más útil. Muchas de las sustituciones de aminoácidos observadas en una familia de proteínas pueden ser de tipo conservador, es decir, aquellas en las que un residuo aminoácido está reemplazado por otro de propiedades químicas similares. Por ejemplo, un residuo de Glu puede sustituir en una proteína a un residuo Asp encontrado en otra proteína de la misma familia; ambos aminoácidos están cargados negativamente. Esta sustitución conservadora debe obtener lógicamente una mayor puntuación en el alineamiento final que otra de tipo no conservador, como la sustitución de un residuo Asp por el residuo hidrofóbico Phe.

En la mayoría de los métodos de búsqueda de homologías y exploración de relaciones evolutivas, las secuencias de proteínas (obtenidas por secuenciación directa de la proteína o por secuenciación del DNA que la codifica) son superiores a las secuencias no génicas de ácidos nucleicos (aquellas que no codifican una proteína o un RNA funcional). Para un ácido nucleico, compuesto de cuatro tipos de residuos diferentes, un alineamiento al azar de secuencias no homólogas dará generalmente coincidencias en, al menos, un 25% de las posiciones. La introducción de un limitado número de huecos puede aumentar fácilmente la fracción de residuos coincidentes hasta el 40% o más, con lo que la probabilidad de obtener alineamientos de secuencias no relacionadas aumenta mucho. Los 20 aminoácidos diferentes de las proteínas reducen considerablemente la probabilidad de obtener alineamientos no informativos de este tipo.

Los programas usados para la generación de alineamientos secuenciales se complementan con métodos que comprueban la fiabilidad de esos alineamientos. Un ensayo informático habitual consiste en desordenar la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas comparadas con el fin de obtener una secuencia al azar para hacer que a continuación el programa alinee la secuencia así "revuelta" con la otra secuencia no modificada. Se asignan puntuaciones al nuevo alineamiento y se



FIGURA 3-33 Alineamiento de secuencias de proteína con el uso de huecos. Se muestra el alineamiento de secuencias de una pequeña parte de las proteínas Hsp70 (una clase muy extendida de chaperonas de plegamiento de proteínas) de dos especies bacterianas bien estudiadas, *E. coli* y *Bacillus subtilis*. La introducción de un hueco en la secuencia de *B. subtilis* permite un alineamiento mejor de los residuos de aminoácido en los dos lados del mismo. Los residuos idénticos están sombreados. [Fuente: Información de R.S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 2.]

repite el proceso muchas veces. El alineamiento original, obtenido antes del desordenamiento de una de las secuencias, debería tener una puntuación significativamente mayor que la de cualquiera de los alineamientos hechos con secuencias al azar; con ello, aumenta la confianza de que el alineamiento secuencial haya identificado una pareja de homólogos. Obsérvese que la ausencia de una puntuación significativa para un determinado alineamiento no significa necesariamente que no exista una relación evolutiva entre dos proteínas. Como veremos en el Capítulo 4, las similitudes en estructura tridimensional ponen a veces de manifiesto relaciones evolutivas en casos en los que la homología secuencial ha sido borrada con el paso del tiempo.

Para usar una familia de proteínas en estudios evolutivos es necesaria la identificación de miembros de esta familia con funciones moleculares similares en la gama de organismos lo más amplia posible. La información extraída de la familia de proteínas puede usarse para seguir la evolución de esos organismos. A partir del análisis de la divergencia genética en familias de proteínas seleccionadas es posible agrupar los organismos en clases basadas en su relación evolutiva. Esta información debe ser comparable a la obtenida a partir de los exámenes clásicos sobre la fisiología y la bioquímica de estos organismos.

Es posible encontrar ciertos segmentos de la secuencia de una proteína en organismos de un grupo taxonómico y no en otros grupos; estos segmentos pueden usarse como **firmas secuenciales** del grupo en el que se hallen. Un ejemplo de firma secuencial es la inserción de 12 aminoácidos cerca del extremo amino-terminal en las proteínas EF1α/EF-Tu en todas las arqueas y eucariotas pero no en bacterias **(Fig. 3-34)**. Esta firma secuencial es una de las muchas claves bioquímicas que pueden ayudar en el establecimiento de las relaciones evolutivas de eucariotas y arqueas. Las firmas secuenciales permiten el establecimiento de relaciones evolutivas entre grupos de organismos en muchos niveles taxonómicos diferentes.

Tomando en consideración la totalidad de la secuencia de una proteína, se pueden construir ahora árboles evolutivos más elaborados que incluyan muchas especies en cada grupo taxonómico. La **Figura 3-35** presenta un árbol de este tipo para bacterias, basado en la divergencia secuencial de la proteína GroEL (una proteína presente en todas las bacterias que colabora en el proceso de plegamiento proteico correcto). El árbol puede refinarse en base a las secuencias de múltiples proteínas y mediante la adición de datos sobre propiedades bioquímicas y fisiológicas únicas de cada especie. Existen muchos métodos para la generación de árboles, cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes, y muchas maneras de representar las relaciones evolutivas resultantes. En la Figura 3-35 los puntos finales libres de las líneas reciben el nombre de "nodos externos"; cada uno de ellos representa una especie existente, y así se describe. Los puntos de intersección de dos líneas, los "nodos internos" representan especies ancestrales extinguidas. En la mayor parte de representaciones (incluida la Figura 3-35), las longitudes de las líneas que conectan los nodos son proporcionales al número de sustituciones de aminoácidos que separan una especie de otra. Si relacionamos dos especies existentes con un nodo interno común (que representa el ancestro común de las dos especies), la longitud de la rama que conecta el nodo externo con el interno representa el número de sustituciones de aminoácidos que separa cada una de las especies existentes de su ancestro. La suma de las longitudes de todos los segmentos que conectan una especie existente con otra a través de un ancestro común refleja el número de sustituciones que separa las dos especies. El árbol debe calibrarse a través de la comparación con informaciones sobre el registro fósil y otras fuentes con el fin de determinar el tiempo necesario para la divergencia de las diferentes especies.

Al ir disponiendo progresivamente de mayor información secuencial en las bases de datos se pueden generar árboles evolutivos basados en múltiples proteínas. Estos árboles se van refinando con la nueva información genómica generada por el uso de métodos de análisis cada vez más refinados. Estos trabajos conducen al objetivo de construir un árbol de la vida suficientemente detallado para poder describir la evolución y las relaciones de cada organismo presente en la Tierra. Por supuesto, éste es un proceso en marcha **(Fig. 3-36)**. En él, las preguntas que se formulan son fundamentales para definir la forma en que los seres humanos se contemplan a sí mismos y al mundo que los rodea. El campo de la evolución molecular promete convertirse en una de las fronteras científicas más vibrantes del siglo XXI.

RESUMEN 3.4 Estructura covalente de proteínas

- Las diferencias en la función proteica son el resultado de diferencias en la composición y en la secuencia de aminoácidos. Para una determinada proteína se permiten algunas variaciones en la secuencia sin que la función se vea afectada.
- Las secuencias de aminoácidos se deducen a partir de la fragmentación de los polipéptidos en péptidos más pequeños mediante el uso de reactivos específicos para cierto tipo de enlaces peptídicos, seguida por la determinación de la secuencia de cada fragmento mediante

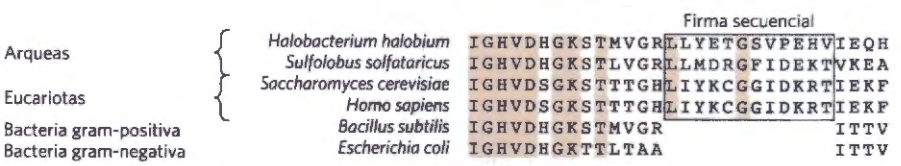


FIGURA 3-34 Firma secuencia de la familia de proteínas EF-1α/EF-Tu. La firma secuencial (encuadrada) es una inserción de 12 residuos cerca del extremo amino-terminal de la secuencia. Los residuos que se alinean bien en las dos secuencias están sombreados. Tanto las arqueas como los eucariotas tienen la firma, a pesar de que las secuencias de las inserciones son bastante distintas entre los dos grupos. La variación en la firma secuencial refleja la divergencia evolutiva significativa que ha tenido lugar en este sitio desde que apareció en un primer ancestro de ambos grupos. [Fuente: Información de R.S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 7.]

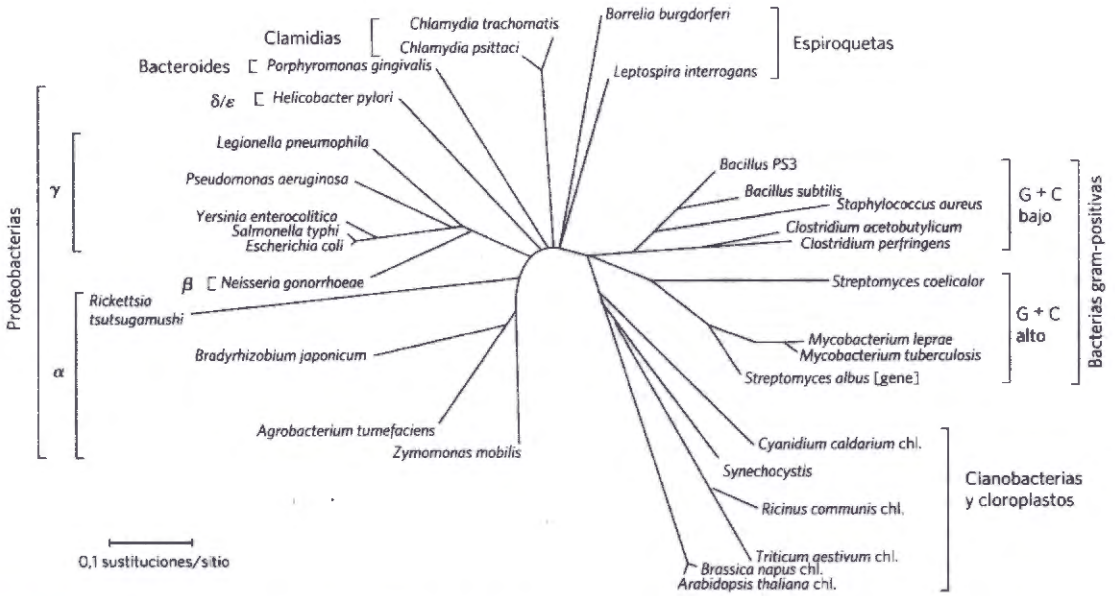


FIGURA 3-35 Árbol evolutivo derivado de comparaciones de secuencias de aminoácidos. Árbol evolutivo bacteriano, basado en la divergencia secuencial observada en la familia de proteínas GroEL. En el árbol también se incluyen los cloroplastos (chl., abajo a la derecha) de algunas especies no bacterianas. [Fuente: Información de R.S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 11.]

degradación automática de Edman y finalmente la ordenación de los fragmentos peptídicos mediante la localización de zonas de solapamiento entre fragmentos generados por reactivos diferentes. También es posible deducir la secuencia de las proteínas a partir de la secuencia de nucleótidos de su gen correspondiente en el DNA o mediante espectrometría de masas.

■ Es posible sintetizar químicamente péptidos y proteínas pequeñas (de hasta unos 100 aminoácidos). El péptido se construye, residuo a residuo, mientras permanece unido a un soporte sólido.

■ Las secuencias de proteínas constituyen una rica fuente de información sobre la estructura y función de proteínas, así como sobre la evolución de la vida sobre la Tierra. Se están desarrollando métodos sofisticados para trazar la evolución mediante el análisis de los lentos cambios que se producen en la secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas.

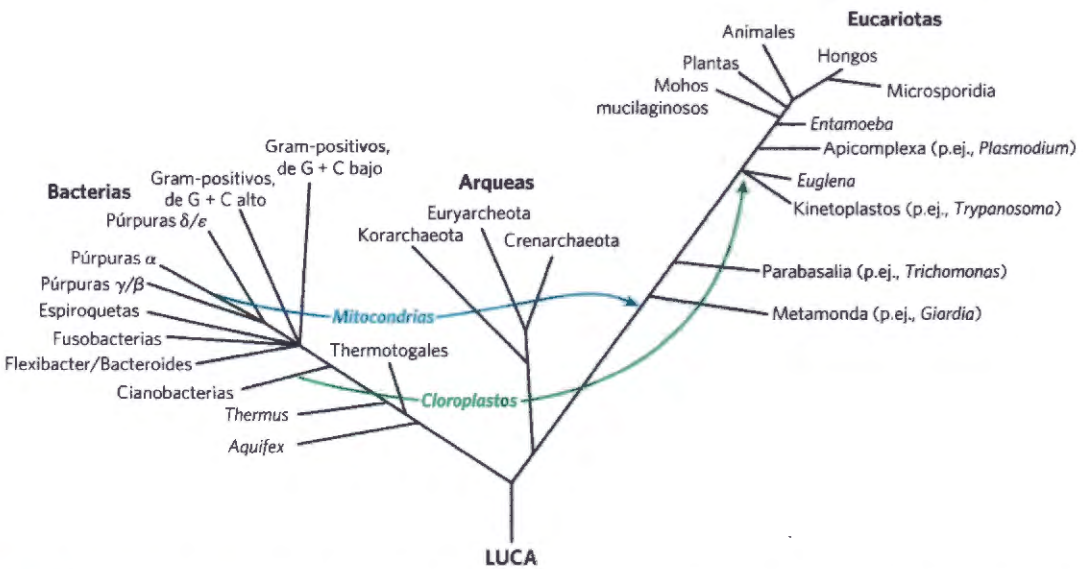


FIGURA 3-36 Árbol de la vida consenso. El árbol que se muestra aquí se basa en el análisis de muchas secuencias de proteínas diferentes y de características genómicas adicionales. El árbol solo presenta una parte de la información disponible, así como solo una fracción de las incógnitas todavía por resolver. Cada grupo existente que se muestra representa una historia evolutiva compleja por sí mismo. LUCA se refiere al último ancestro universal común (*last universal common ancestor*) a partir del cual evolucionaron todas las demás formas de vida. Las flechas verde y azul indican la asimilación endosimbiótica de tipos especiales de bacterias en células eucarióticas que las convirtieron en mitocondrias y cloroplastos, respectivamente (véase la Fig. 1-40). [Fuente: Información de F. Delsuc et al., *Nature Rev. Genet.* 6:363, 2005, Fig. 1.]

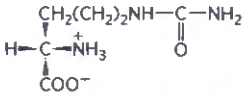
Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

aminoácidos 76
residuo 76
grupo R 76
centro quiral 76
enantiómeros 76
configuración absoluta 78
sistema D, L 78
polaridad 79
absorbancia, *A* 80
zwitterion 81
pH isoeléctrico (punto isoeléctrico, pI) 84
péptido 85
proteína 85
enlace peptídico 85
oligopéptido 85
polipéptido 85
proteína oligomérica 87
protómero 87
proteína conjugada 88
grupo prostético 88
extracto crudo 89
fracción 89
fraccionamiento 89
diálisis 89
cromatografía de columna 89
cromatografía de intercambio iónico 89
cromatografía de filtración en gel 92
cromatografía de afinidad 92
cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) 92
electroforesis 92
dodecil sulfato sódico (SDS) 92
enfoque isoeléctrico 94
actividad específica 94
estructura primaria 96
estructura secundaria 96
estructura terciaria 96
estructura cuaternaria 96
degradación de Edman 97
proteasas 98
MALDI MS 100
ESI MS 100
secuencia consenso 104
bioinformática 104
transferencia génica lateral 105
proteínas homólogas 106
homólogos 106
parálogos 106
ortólogos 106
firma secuencial 107

Problemas

1. Configuración absoluta de la citrulina La citrulina aislada de la sandía tiene la estructura que se muestra a continuación. ¿Es un aminoácido D o L? Explique el porqué.



2. Relación entre la curva de titulación y las propiedades ácido-base de la glicina Una disolución de 100 mL de glicina 0,1 M a pH 1,72 se tituló con una disolución de NaOH 2 M. Se registraron los valores de pH y los resultados se representaron en una gráfica, tal como se muestra en el gráfico. Los puntos clave de la titulación se señalan de I a V. Para cada una de las afirmaciones siguientes, (a) a (o) *identifique* el punto clave adecuado de la titulación y *justifique* su elección.

(a) La glicina está presente predominantemente en la forma $+H_3N—CH_2—COOH$.

(b) La carga neta *media* de la glicina es +½.

(c) La mitad de los grupos amino están ionizados.

(d) El pH es igual al pK_a del grupo carboxilo.

(e) El pH es igual al pK_a del grupo amino protonado.

(f) La glicina tiene su máxima capacidad tamponante.

(g) La carga neta *media* de la glicina es igual a cero.

(h) El grupo carboxilo ha sido titulado completamente (primer punto de equivalencia).

(i) La glicina está totalmente titulada (segundo punto de equivalencia).

(j) La especie predominante es $+H_3N—CH_2—COO^-$.

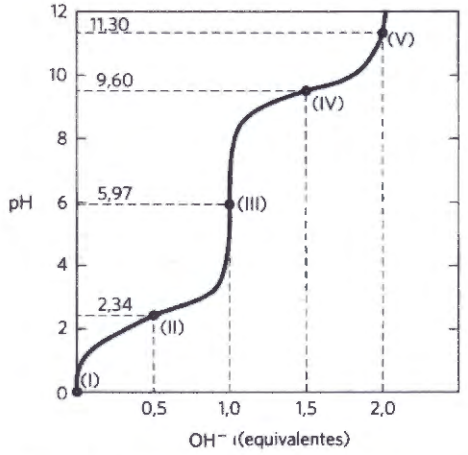
(k) La carga neta *media* de la glicina es –1.

(l) La glicina está presente predominantemente como una mezcla 50:50 de $+H_3N—CH_2—COOH$ y $+H_3N—CH_2—COO^-$.

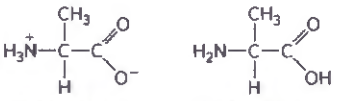
(m) Corresponde al punto isoeléctrico.

(n) Corresponde al final de la titulación.

(o) Representan las *peores* regiones de pH en cuanto al poder tamponante.



3. ¿Cuánta alanina está presente como especie completamente sin carga? A un pH igual a su punto isoeléctrico, la carga *neta* de la alanina es cero. Se pueden dibujar dos estructuras con una carga neta de cero, pero la forma predominante de la alanina a su pI es zwitteriónica.



(a) ¿Por qué la alanina es predominantemente zwitteriónica y no está completamente descargada en su pI?

(b) ¿Qué fracción de alanina está presente en su pI como forma completamente descargada? Justifique sus respuestas.

4. Estado de ionización de la histidina Cada grupo ionizable de un aminoácido puede existir en uno de dos estados posibles, cargado o neutro. La carga eléctrica del grupo funcional viene determinada por la relación entre su pK_a y el pH de la solución. Esta relación viene descrita por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

(a) La histidina tiene tres grupos funcionales ionizables. Escriba las ecuaciones de equilibrio pertinentes para sus tres ionizaciones y asigne el pK_a adecuado de cada ionización. Dibuje la estructura de la histidina en cada estado de ionización. ¿Cuál es la carga neta de la molécula de histidina en cada estado de ionización?

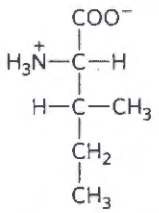
(b) Dibuje las estructuras de los estados de ionización de la histidina predominantes a pH 1, 4, 8 y 12. Observe que el estado de ionización puede ser obtenido aproximadamente tratando independientemente cada grupo ionizable.

(c) ¿Cuál es la carga neta de la histidina a pH 1, 4, 8 y 12? Cuando se coloca en un campo eléctrico a cada uno de estos valores de pH ¿Se desplazará la histidina hacia el ánodo (+) o hacia el cátodo (–)?

5. Separación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico El análisis de mezclas de aminoácidos empieza separando la mezcla en sus componentes mediante cromatografía de intercambio iónico. En una columna con una resina que contiene grupos sulfonato ($—SO_3^-$) (véase la Fig. 3-17a) los aminoácidos fluyen a diferente velocidad debido a dos factores que retardan su movimiento: (1) la atracción iónica entre los residuos sulfonato de la columna y grupos funcionales cargados positivamente en los aminoácidos y (2) las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos y el esqueleto fuertemente hidrofóbico de la resina de poliestireno. Para cada par de aminoácidos señalados, determine cual eluirá antes en una columna de intercambio catiónico con un tampón a pH 7,0.

(a) Aspartato y Lisina
(b) Arginina y Metionina
(c) Glutamato y Valina
(d) Glicina y Leucina
(e) Serina y Alanina

6. Nomenclatura de estereoisómeros de la isolencina La estructura del aminoácido isoleucina es:



(a) ¿Cuántos centros quirales tiene?
(b) ¿Cuántos isómeros ópticos?
(c) Dibuje fórmulas de perspectiva de todos los isómeros ópticos de la isoleucina.

7. Comparación de los valores de pK_a de la alanina y polialanina La curva de titulación de la alanina muestra la ionización de dos grupos funcionales con valores de pK_a de 2,34 y 9,69, correspondientes a la ionización de los grupos carboxilo y amino protonado, respectivamente. La titulación de di-, tri- y oligopéptidos mayores de la alanina también muestra la ionización de sólo dos grupos funcionales, aunque los valores experimentales de pK_a son diferentes. La tendencia de los valores de pK_a se resume en la tabla.

Aminoácido o péptido	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala–Ala	3,12	8,30
Ala–Ala–Ala	3,39	8,03
Ala–$(Ala)_n$–Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

(a) Dibuje la estructura de Ala-Ala-Ala. Identifique los grupos funcionales asociados con pK_1 y pK_2.
(b) ¿Por qué *aumenta* el valor de pK_1 en cada adición de un residuo Ala al oligopéptido de Ala?
(c) ¿Por qué *disminuye* el valor de pK_2 en cada adición de un residuo Ala al oligopéptido de Ala?

8. Tamaño de las proteínas ¿Cuál es la masa molecular aproximada de una proteína de 682 residuos aminoácidos en una única cadena polipeptídica?

9. Número de residuos de triptófano en la albúmina de suero bovino Un análisis cuantitativo de aminoácidos indica que la albúmina de suero bovino (BSA) contiene 0,58 % en peso de triptófano (M_r 204).

(a) Calcule la masa molecular *mínima* de la BSA (es decir, suponiendo que haya un solo residuo de triptófano por molécula de proteína).

(b) Una cromatografía de exclusión molecular de la BSA da una estimación de masa molecular de unos 70.000. ¿Cuántos residuos de Trp hay en una molécula de albúmina de suero?

10. Composición de subunidades de una proteína Una proteína tiene una masa molecular de 400 kDa medida por cromatografía de exclusión molecular. Si se analiza mediante electroforesis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), la proteína muestra tres bandas de masas moleculares 180, 160 y 60 kDa. Cuando la electroforesis se realiza en presencia de SDS y ditiotreitol se observan también tres bandas de masa moleculares 160, 89 y 60 kDa. Determine la composición subunitaria de la proteína.

11. Carga eléctrica neta de los péptidos Un péptido tiene la secuencia

Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

(a) ¿Cuál es la carga neta de la molécula a pH 3, 8 y 11? (Utilice los valores de pK_a para las cadenas laterales y grupos amino y carboxilo-terminales dados en la Tabla 3-1).
(b) Estime el pI de este péptido.

12. Punto isoeléctrico de la pepsina Se da el nombre de pepsina a una mezcla de varios enzimas digestivos secretados (en forma de proteínas precursoras mayores) por las glándulas que recubren el estómago. Estas glándulas secretan también ácido clorhídrico, que disuelve la materia en forma de partículas de la comida, permitiendo que la pepsina corte enzimáticamente moléculas individuales de proteína. La mezcla resultante de comida, HCl, y enzimas digestivos se denomina quimo y tiene un pH cercano a 1,5. ¿Qué pI predeciría para las proteínas de tipo pepsina? ¿Qué grupos funcionales han de estar presentes para proporcionar este pI a la pepsina? ¿Qué aminoácidos pueden aportar tales grupos a las proteínas?

13. Punto isoeléctrico de las histonas Las histonas son proteínas que se encuentran en el núcleo de las células eucarióticas, fuertemente unidas al DNA, el cual tiene muchos grupos fosfato. El pI de las histonas es muy elevado, alrededor de 10,8. ¿Qué aminoácidos deben estar presentes en número relativamente elevado en las histonas? ¿En qué forma contribuyen estos residuos a la fuerte unión entre las histonas y el DNA?

14. Solubilidad de los polipéptidos Un método utilizado en la separación de polipéptidos se basa en sus diferentes solubilidades. La solubilidad de los polipéptidos grandes en agua depende de la polaridad relativa de sus grupos R, especialmente del número de grupos ionizados: cuantos más grupos ionizados haya más soluble será el polipéptido. De los pares de polipéptidos siguientes ¿cuál es más soluble al pH indicado?

(a) $(Gly)_{20}$ o $(Glu)_{20}$ a pH 7,0
(b) $(Lys\text{-}Ala)_3$ o $(Phe\text{-}Met)_3$ a pH 7,0
(c) $(Ala\text{-}Ser\text{-}Gly)_5$ o $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ a pH 6,0
(d) $(Ala\text{-}Asp\text{-}Gly)_5$ o $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ a pH 3,0

15. Purificación de un enzima Un bioquímico descubre y purifica un enzima nuevo generando la siguiente tabla de purificación:

Procedimiento	Proteína total (mg)	Actividad (unidades)
1. Extracto crudo	20.000	4.000.000
2. Precipitación (sal)	5.000	3.000.000
3. Precipitación (pH)	4.000	1.000.000
4. Cromatografía de intercambio iónico	200	800.000
5. Cromatografía de afinidad	50	750.000
6. Cromatografía de exclusión molecular	45	675.000

(a) A partir de la información dada en la tabla, calcule la actividad específica de la solución enzimática después de cada procedimiento de purificación.

(b) ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con este enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento en pureza)?

(c) ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?

(d) ¿Hay alguna indicación en los resultados de esta tabla de que el enzima tras el paso 6 sea ya puro? ¿Qué más se podría hacer para estimar la pureza de la preparación enzimática?

16. Diálisis Una proteína purificada se encuentra en un tampón Hepes (*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-etanosulfónico) a pH 7 con NaCl 500 mM. Una muestra (1 mL) de la disolución de proteína se coloca en un tubo hecho con una membrana de diálisis y se dializa frente a 1 L del mismo tampón Hepes con 0 mM de NaCl. Las moléculas e iones pequeños (como Na^+, Cl^- y Hepes) pueden difundir a través de la membrana de diálisis, pero no la proteína.

(a) Al llegar la diálisis al equilibro, ¿cuál es la concentración de NaCl en la muestra de proteína? Suponga que no se producen variaciones de volumen durante la diálisis.

(b) Si la muestra original de 1 mL se dializara dos veces sucesivas frente a 100 mL del mismo tampón Hepes con 0 mM de NaCl, ¿Cuál sería la concentración final de NaCl en la muestra?

17. Purificación de péptidos A pH 7,0, ¿cuál sería el orden de elución de una columna llena de polímero intercambiador de cationes de los tres péptidos siguientes? Sus composiciones de aminoácidos son:

Péptido A: Ala 10%, Glu 5%, Ser 5%, Leu 10%, Arg 10%, His 5%, Ile 10%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 10%, Gly 10%, Pro 5% y Trp 10%.

Péptido B: Ala 5%, Val 5%, Gly 10%, Asp 5%, Leu 5%, Arg 5%, Ile 5%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 5%, Trp 5%, Ser 5%, Thr 5%, Glu 5%, Asn 5%, Pro 10%, Met 5% y Cys 5%.

Péptido C: Ala 10%, Glu 10%, Gly 5%, Leu 5%, Asp 10%, Arg 5%, Met 5%, Cys 5%, Tyr 5%, Phe 5%, His 5%, Val 5%, Pro 5%, Thr 5%, Ser 5%, Asn 5% y Gln 5%.

18. Determinación de la secuencia del péptido cerebral leucina-encefalina A partir de tejido cerebral normal se ha aislado un grupo de péptidos que influyen sobre la transmisión nerviosa en ciertas partes del cerebro. Estos péptidos se conocen como opioides debido a que se fijan a receptores que se unen también a drogas opiáceas, tales como la morfina y la naloxona. De este modo los opioides imitan algunas de las propiedades de los opiáceos. Algunos investigadores consideran que estos péptidos son los inhibidores del dolor propios del cerebro. Utilizando la información que se da a continuación, determine la secuencia de aminoácidos del opioide leucina-encefalina. Explique por qué su estructura está de acuerdo con todos los datos aportados.

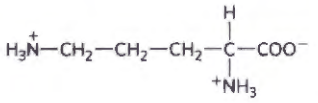
(a) La hidrólisis completa por HCl 6 M a 110°C seguida de análisis de aminoácidos indica la presencia de Gly, Leu, Phe y Tyr en una proporción molar 2:1:1:1.

(b) El tratamiento del péptido con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno seguido por hidrólisis completa y cromatografía indicó la presencia del 2,4-dinitrofenil derivado de la tirosina. No se encontró tirosina libre.

(c) La digestión completa del péptido con quimotripsina seguido de cromatografía dio lugar a un dipéptido que contenía Phe y Leu, más un tripéptido que contenía Tyr y Gly en una proporción 1:2

19. Estructura de un antibiótico peptídico de *Bacillus brevis* Los extractos de la bacteria *Bacillus brevis* contienen un péptido con propiedades antibióticas. Este péptido forma complejos con los iones metálicos y, aparentemente, interfiere en el transporte iónico a través de las membranas celulares de ciertas especies bacterianas, matándolas. La estructura del péptido se ha determinado a partir de las siguientes observaciones.

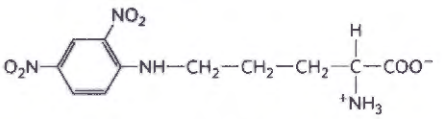
(a) La hidrólisis ácida completa del péptido seguida de análisis de aminoácidos produce cantidades equimoleculares de Leu, Orn, Phe, Pro y Val. Orn es ornitina, un aminoácido que no se halla presente en las proteínas pero que se encuentra en algunos péptidos. Tiene la estructura



(b) La masa molecular del péptido se calculó en alrededor de 1.200.

(c) Cuando se trató con el enzima carboxipeptidasa el péptido no experimentó hidrólisis alguna. Este enzima cataliza la hidrólisis del residuo carboxilo-terminal de un polipéptido a menos que el residuo sea Pro o no contenga un grupo carboxilo libre por alguna razón.

(d) El tratamiento del péptido intacto con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, seguido de hidrólisis completa y cromatografía, dio sólo aminoácidos libres y el siguiente derivado:



(Sugerencia: observe que el 2,4-dinitrofenil derivado implica el grupo amino de una cadena lateral y no el grupo α-amino.)

(e) La hidrólisis parcial del péptido seguida de separación cromatográfica y análisis de secuencia dio lugar a los di- y tripéptidos siguientes (el aminoácido amino-terminal siempre se encuentra a la izquierda):

Leu-Phe Phe-Pro Orn-Leu Val-Orn
Val-Orn-Leu Phe-Pro-Val Pro-Val-Orn

Dada la información anterior, deduzca la secuencia de aminoácidos del antibiótico peptídico. Exponga sus razonamientos. Cuando haya llegado a una estructura, demuestre que es coherente con *cada una* de las observaciones experimentales.

20. Eficiencia de la secuenciación de péptidos Un péptido con la estructura primaria Lys-Arg-Pro-Leu-Ile-Asp-Gly-Ala se secuencia por el procedimiento de Edman. Si cada ciclo

de Edman tuviera una eficiencia del 96%, qué porcentaje de los aminoácidos liberados en el cuarto ciclo sería leucina? Haga el cálculo de nuevo, suponiendo en esta ocasión una eficiencia del 99% para cada ciclo.

21. Comparación de secuencias Las proteínas denominadas chaperonas moleculares (descritas en el Capítulo 4) ayudan en el proceso de plegamiento de las proteínas. Una clase de chaperonas presente desde bacterias a mamíferos es la proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Todas la chaperonas Hsp90 contienen una "firma secuencial" de 10 aminoácidos que permite su rápida identificación en las bases de datos secuenciales. A continuación se muestran dos representaciones de esta firma secuencial:

Y-x-[NQHD]-[KHR]-[DE]-[IVA]-F-[LM]-R-[ED].



(a) ¿Qué aminoácidos son invariantes (conservados en todas las especies) en esta secuencia?

(b) ¿En qué posición(es) está la naturaleza del aminoácido limitada a los de cadena lateral con carga positiva? ¿Qué aminoácido se encuentra con más frecuencia en cada posición?

(c) ¿En qué posiciones se restringen las sustituciones a los aminoácidos con cadena lateral de carga negativa? ¿Qué aminoácido predomina en cada posición?

(d) En una de las posiciones puede haber cualquier aminoácido, aunque uno de ellos aparece con mucha mayor frecuencia que los demás. ¿Qué posición es ésta y cuál es el aminoácido?

22. Métodos cromatográficos Una mezcla contiene tres polipéptidos cuyas secuencias se muestran a continuación representadas mediante el código de una sola letra para los aminoácidos:

1. ATKNRASCLVPKHGALMFWRHKQLVSDPILQKRQHILLV-CRNAAG
2. GPYFGDEPLDVHDEPEEG
3. PHLLSAWKGMEGVGKSQSFAALIVILA

De los tres, ¿cuál migrará más lentamente durante una cromatografía en

(a) una resina de intercambio iónico con las partículas recubiertas con grupos cargados positivamente?

(b) una resina de intercambio iónico con las partículas recubiertas con grupos cargados negativamente?

(c) una columna de exclusión molecular (filtración en gel) diseñada para separar péptidos pequeños como éstos?

(d) ¿Qué péptido contiene el motivo de unión a ATP que se muestra en el siguiente logo secuencial?

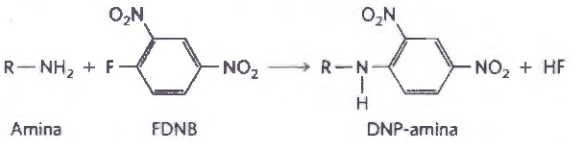


Problema de análisis de datos

23. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la insulina La Figura 3-24 muestra la secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. Esta estructura fue determinada por Frederick Sanger y colaboradores. La mayor parte de su trabajo se describe en una serie de artículos publicados en *Biochemical Journal* entre 1945 y 1955.

Cuando Sanger y sus colegas comenzaron su trabajo en 1945 se sabía que la insulina era una proteína pequeña consistente en dos o cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro. Sanger y sus colaboradores habían desarrollado una serie de métodos simples para secuenciar proteínas.

Tratamiento con FDNB. El FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) reaccionaba con los grupos amino libres (pero no con grupos amido o guanidino) de las proteínas produciendo derivados dinitrofenilo (DNP) de los aminoácidos.



Hidrólisis ácida. Hirviendo una proteína durante varias horas en HCl al 10% se hidrolizaban todos sus enlaces peptídicos y amida. Tratamientos más cortos generaban polipéptidos cortos; cuanto más largo era el tratamiento, más completa era la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos.

Oxidación de las cisteínas. El tratamiento una proteína con ácido perfórmico rompía todos los enlaces disulfuro y convertía todos los residuos Cys a ácido cisteico (véase la Fig. 3-28).

Cromatografía en papel. Esta versión más primitiva que la cromatografía en capa fina (véase la Fig. 10-25) separaba compuestos en base a sus propiedades químicas, permitiendo la identificación de aminoácidos individuales y, en ocasiones, de dipéptidos. La cromatografía en capa fina separa también péptidos más grandes.

Como se describe en su primer artículo (1945) Sanger hizo reaccionar insulina con FDNB e hidrolizó la proteína resultante. Encontró muchos aminoácidos libres pero sólo tres DNP-aminoácidos: α-DNP-glicina (con el grupo DNP unido al grupo α-amino); α-DNP-fenilalanina; y ε-DNP-lisina (con el grupo DNP unido al grupo ε-amino). De estos resultados Sanger dedujo que la insulina constaba de dos cadenas de proteína: una con Gly y otra con Phe en el extremo amino-terminal. Una de las dos cadenas contenía también un residuo Lys, pero no en su extremo amino. A la cadena que empezaba con Gly la llamó "A" y a la que empezaba con Phe la llamó "B".

(a) Explique cómo justifican los experimentos de Sanger sus conclusiones.

(b) ¿Son estos resultados consistentes con la estructura conocida de la insulina (Fig. 3-24)?

En un artículo posterior (1949), Sanger describió el modo en que utilizó estas técnicas para determinar los primeros aminoácidos (el extremo amino-terminal) de cada cadena de insulina. Por ejemplo, para analizar la cadena B, llevó a cabo los pasos siguientes:

1. Oxidó la insulina para separar las cadenas A y B.
2. Preparó una muestra de cadena B pura por cromatografía en papel.
3. Hizo reaccionar la cadena B con FDNB.
4. Hidrolizó la proteína suavemente en medio ácido para producir algunos péptidos más cortos.
5. Separó los DNP-péptidos de los que no contenían grupos DNP.
6. Aisló cuatro de los DNP-péptidos, que recibieron los nombres B1 a B4.

Llevó a cabo una hidrólisis fuerte de cada DNP-péptido para obtener aminoácidos libres.

Identificó los aminoácidos de cada péptido mediante cromatografía en papel.

Obtuvo los resultados siguientes:

B1: solamente α-DNP-fenilalanina

B2: α-DNP-fenilalanina; valina

B3: ácido aspártico; α-DNP-fenilalanina; valina

B4: ácido aspártico; ácido glutámico; α-DNP-fenilalanina; valina

(c) En base a estos datos, ¿cuáles son los cuatro primeros aminoácidos de la cadena B (el extremo amino-terminal)? Explique su razonamiento.

(d) ¿Coincide el resultado con la secuencia conocida de la insulina (Figura 3-24)? Explique las discrepancias si las hay.

Sanger y sus colaboradores usaron éstos y otros métodos relacionados para determinar la secuencia completa de las cadenas A y B. Su secuencia para la cadena A era como sigue (extremo amino a la izquierda):

1 5 10
Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
15 20
Cys–Ser–Leu–Tyr–Glx–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asx

Al haberse convertido todos los residuos Asn a Asp y todos los residuos Gln a Glu a causa de la hidrólisis ácida hubo que designar a estos residuos como Asx y Glx, respectivamente (no se conocía su identidad exacta en el péptido). Sanger solucionó este problema usando enzimas proteolíticos que rompen enlaces peptídicos, pero no los enlaces amida de Asn y Gly, para preparar péptidos más cortos. A continuación determinó el número de grupos amino presente en cada péptido cuantificando el NH_4^+ liberado cuando el péptido era sometido a hidrólisis ácida. A continuación se muestran algunos de los resultados para la cadena A. Es posible que los péptidos no fueran completamente puros por lo que los números eran aproximados, aunque suficientemente buenos para los propósitos de Sanger.

Nombre del péptido	Secuencia del péptido	Número de grupos amino en el péptido
Ac1	Cys–Asx	0,7
Ap15	Tyr–Glx–Leu	0,98
Ap14	Tyr–Glx–Leu–Glx	1,06
Ap3	Asx–Tyr–Cys–Asx	2,10
Ap1	Glx–Asx–Tyr–Cys–Asx	1,94
Ap5pa1	Gly–Ile–Val–Glx	0,15
Ap5	Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–Cys–Ser–Leu	1,16

(e) En base a estos datos, determine la secuencia de aminoácidos de la cadena A. Explique cómo obtuvo su respuesta. Compárela con la Figura 3-24.

Referencias

Sanger, F. 1945. The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* 39:507–515.

Sanger, F. 1949. The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* 45:563–574.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 4

Estructura tridimensional de las proteínas

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

4.1 **Visión general de la estructura de las proteínas** 116

4.2 **Estructura secundaria de las proteínas** 120

4.3 **Estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas** 125

4.4 **Desnaturalización y plegamiento de proteínas** 142

Las proteínas son moléculas grandes. El esqueleto covalente de una proteína típica se compone de centenares de enlaces individuales. Dado que es posible la rotación libre alrededor de muchos de estos enlaces, las proteínas pueden adoptar, en principio, un número ilimitado de conformaciones. Sin embargo, cada proteína tiene una función química o estructural específica, lo que sugiere que cada proteína posee una estructura tridimensional única **(Fig. 4-1)**. ¿Qué estabilidad tiene esta estructura? ¿Qué factores guían su formación y como se mantiene estable? A finales de los años 1920 se habían cristalizado varias proteínas, entre ellas la hemoglobina (M_r 64.500) y el enzima ureasa (M_r 483.000). Dado que, en general, la ordenación de las moléculas en un cristal sólo se puede dar cuando las unidades moleculares que componen el cristal son idénticas, el simple hecho de que las proteínas puedan cristalizar es una prueba muy importante de que incluso las proteínas muy grandes son entidades químicas discretas con estructura única. Esta conclusión revolucionó el pensamiento vigente acerca de las proteínas y sus funciones, pero dio lugar a una visión incompleta. La estructura de las proteínas siempre es maleable, a veces de manera sorprendente. Los cambios estructurales pueden ser tan importantes para la función de la proteína como la estructura misma.

En este capítulo exploraremos la estructura de las proteínas. Haremos énfasis en seis temas. En primer lugar, la estructura o estructuras tridimensionales adoptadas por una proteína vienen determinadas por su secuencia de aminoácidos. En segundo lugar, la función de una proteína depende de su estructura. En tercer lugar, la mayoría de proteínas aisladas existen en una única forma estructural o un pequeño número de ellas. En cuarto lugar, las fuerzas más importantes que estabilizan la estructura específica de una proteína son de naturaleza no covalente; el efecto hidrofóbico es particularmente importante. En quinto lugar, dentro del gran número de estructuras proteicas únicas, es posible reconocer algunos patrones estructurales comunes que nos ayudan a organizar nuestro conocimiento sobre la arquitectura de las proteínas. Finalmente, la estructura de las proteínas no es estática. Todas las proteínas experimentan cambios de conformación, que pueden ser sutiles o espectaculares. Partes de muchas proteínas no poseen estructura discernible. Para algunas proteínas, la falta de estructura definida resulta básica para su función

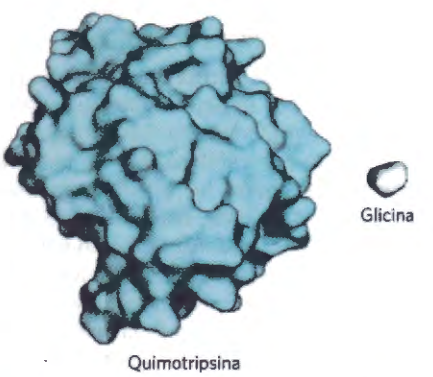


FIGURA 4-1 Estructura del enzima quimotripsina, una proteína globular. Se muestra una molécula de glicina (gris) para la comparación de tamaños. Las estructuras tridimensionales conocidas de proteínas se almacenan en el Protein Data Bank o PDB (véase el Recuadro 4-4). La imagen que se muestra aquí se elaboró utilizando el archivo PDB ID 6GCH. [Fuente: PDB ID 6GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29:7600, 1990.]

4.1 Visión general de la estructura de las proteínas

Se denomina **conformación** a la disposición espacial de los átomos de una proteína o parte de la misma. La posibles conformaciones de una proteína o segmento proteico incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. Un cambio de conformación puede ser, por ejemplo, el resultado de la rotación alrededor de enlaces sencillos. De entre las numerosas conformaciones teóricamente posibles para una proteína que contiene cientos de enlaces sencillos, hay una o, más generalmente, unas pocas, que predominan en condiciones biológicas. La necesidad de la existencia de múltiples conformaciones estables refleja los cambios que deben producirse en la mayor parte de proteínas cuando se unen a otras moléculas o catalizan reacciones. Las conformaciones existentes en unas condiciones determinadas son generalmente las más estables termodinámicamente, es decir, las que poseen la menor energía libre de Gibbs (G). Las proteínas que se encuentran en cualquiera de sus conformaciones funcionales y plegadas se denominan proteínas **nativas**.

Para la mayor parte de proteínas una estructura particular o un conjunto limitado de ellas son cruciales para su función. Sin embargo, partes de las proteínas carecen de estructura en muchos casos. Estos segmentos están intrínsecamente desordenados. En un pequeño número de casos, proteínas enteras se hallan intrínsecamente desordenadas a pesar de ser plenamente funcionales.

¿Qué principios determinan cuáles son las conformaciones más estables de una proteína? El conocimiento de la conformación de una proteína puede construirse paso a paso a partir de la discusión sobre la estructura primaria en el Capítulo 3 y mediante la consideración de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. A este enfoque tradicional se debe añadir un nuevo énfasis sobre patrones de plegamiento comunes y clasificables, también denominados estructuras supersecundarias, plegamientos o motivos, que proporcionan un adecuado contexto organizativo a este complejo esfuerzo. Empezaremos por establecer algunos principios indicadores.

La conformación de una proteína está estabilizada principalmente por interacciones débiles

En el contexto de la estructura de proteínas, el termino **estabilidad** puede definirse como la tendencia a mantener la conformación nativa. Las proteínas nativas solo son marginalmente estables. La ΔG entre los estados plegado y desplegado en condiciones fisiológicas se encuentra, normalmente, en el intervalo de tan solo 20 a 65 kJ/mol. Una cadena polipeptídica determinada puede asumir teóricamente incontables conformaciones diferentes, lo que hace que su estado desplegado se caracterice por un alto valor de la entropía conformacional. Este valor de la entropía, junto con las interacciones por enlace de hidrógeno de muchos grupos de la cadena polipeptídica con el disolvente (agua), tiende a favorecer el mantenimiento del estado desplegado. Entre las interacciones químicas que contrarrestan estos efectos y estabilizan la conformación nativa se incluyen los enlaces disulfuro (covalentes) y las interacciones débiles (no covalentes) descritas en el Capítulo 2: enlaces de hidrógeno, efecto hidrofóbico e interacciones iónicas.

Muchas proteínas carecen de enlaces disulfuro. El medio intracelular es en la mayoría de casos muy reductor debido a las elevadas concentraciones de sustancias reductoras como el glutatión, por lo que la mayoría de grupos sulfhidrilo permanecen en estado reducido. En el exterior de la célula el ambiente es a menudo más oxidante y la formación de enlaces disulfuro es más probable. En eucariotas, los enlaces disulfuro se encuentran principalmente en las proteínas secretadas extracelularmente (por ejemplo, en la hormona insulina). Los enlaces disulfuro son también escasos en proteínas bacterianas. Sin embargo, las bacterias termofílicas, así como las arqueas, suelen tener muchas proteínas con enlaces disulfuro estabilizantes, lo que probablemente constituye una adaptación para la vida a temperaturas elevadas.

En todas las proteínas de todos los organismos las interacciones débiles son de especial importancia para el plegamiento de las cadenas polipeptídicas en sus estructuras secundaria y terciaria. La asociación de múltiples polipéptidos para la formación de estructuras cuaternarias también depende de las interacciones débiles.

La rotura de un solo enlace covalente requiere cerca de 200 a 460 kJ/mol, mientras que las interacciones débiles pueden romperse con tan sólo de 0,4 a 30 kJ/mol. Los enlaces covalentes individuales que contribuyen a las conformaciones nativas de proteínas, tales como los enlaces disulfuro que unen partes separadas de una única cadena polipeptídica, son claramente mucho más fuertes que las interacciones débiles individuales. Sin embargo, al ser tan numerosas, las interacciones débiles son las que predominan como fuerza estabilizante de la estructura de las proteínas. En general, la conformación proteica de menor energía libre (es decir, la conformación más estable) es la que posee el mayor número de interacciones débiles.

La estabilidad de una proteína no es únicamente el resultado de la suma de las energías libres de formación de las muchas interacciones débiles de su interior. Por cada uno de los enlaces de hidrógeno formado en una cadena polipeptídica durante el plegamiento, se debe romper otro enlace de hidrógeno (de energía similar) entre el mismo grupo y el agua. La contribución en estabilidad neta de un enlace de hidrógeno, o la *diferencia* de energía libre entre el estado plegado y el desplegado, puede ser cercana a cero. Las interacciones iónicas pueden ser estabilizantes o desestabilizantes. Debemos buscar, pues, otras explicaciones para saber por qué la conformación nativa de una proteína se encuentra favorecida.

Al examinar cuidadosamente la contribución de las interacciones débiles a la estabilidad de las proteínas, observamos que suele predominar el **efecto hidrofóbico**. El agua pura contiene una red de moléculas de H_2O unidas por puentes de hidrógeno. Ninguna otra molécula tiene el potencial de formación de enlaces hidrógeno del agua, y la presencia de otras moléculas en una disolución acuosa perturba los enlaces de hidrógeno del agua. Cuando el agua rodea una molécula hidrofóbica, la optimización de los enlaces de hidrógeno da como resultado la formación de una **capa de solvatación** de agua altamente estructurada en la inmediata proximidad de la molécula (véase la Fig. 2-7). El incremento del orden de las moléculas de agua en la capa de solvata-

ción tiene como consecuencia un descenso desfavorable en la entropía del agua. Sin embargo, cuando los grupos hidrofóbicos se agrupan se reduce la capa de solvatación al no presentar cada uno de los grupos toda su superficie a la disolución. Como resultado de ello se produce un aumento favorable de la entropía. Como se decía en el Capítulo 2, este aumento de la entropía es la principal fuerza termodinámica que promueve la asociación de grupos hidrofóbicos en disolución acuosa. Por esta razón, las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos tienden a empaquetarse en el interior de la proteína, evitando su interacción con el agua (piense en lo que ocurre con una gota de aceite en agua). De este modo, las secuencias de aminoácidos de la mayoría de proteínas presentan un contenido significativo de residuos con cadena lateral hidrofóbica (en especial Leu, Ile, Val, Phe y Trp). Estos residuos se posicionan de manera que quedan agrupados formando un núcleo hidrofóbico cuando se pliega la proteína.

En condiciones fisiológicas la formación de enlaces de hidrógeno en una proteína es también un proceso dirigido en gran medida por este mismo efecto entrópico. Los grupos polares pueden formar normalmente enlaces de hidrógeno con el agua y son, por tanto, solubles en ella. Sin embargo, el número de enlaces de hidrógeno por unidad de masa es generalmente mayor en el agua pura que en cualquier otro líquido o disolución, por lo que existen límites a la solubilidad incluso para las moléculas más polares a causa de la disminución neta de enlaces de hidrógeno por unidad de masa que se produce cuando están presentes. En consecuencia, y hasta cierto punto, también se formará una capa de solvatación alrededor de las moléculas polares. A pesar de que la energía de formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre dos grupos polares de una macromolécula se compensa en gran parte por la eliminación de las interacciones entre estos mismos grupos y el agua, la desestructuración del agua al producirse la interacción intramolecular proporciona una fuerza entrópica impulsora del plegamiento. La mayor parte de la variación neta de energía libre que se produce al formarse interacciones débiles en el interior de las proteínas es, por tanto, una consecuencia del aumento en entropía en la disolución acuosa circundante debido a la interiorización de superficies hidrofóbicas. Esto contrarresta con creces la gran pérdida de entropía conformacional del polipéptido que está limitado a su conformación plegada.

El efecto hidrofóbico juega un papel especialmente importante en la estabilización de la conformación de las proteínas; el interior de una proteína estructurada es generalmente un núcleo densamente empaquetado de cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácidos. También es importante que cualquier grupo polar o cargado situado en el interior de la proteína tenga cerca otros grupos adecuados para el establecimiento de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas. La contribución de un enlace de hidrógeno a la estabilidad de la estructura nativa parece pequeña, pero la presencia de grupos con potencial de formación de puente de hidrógeno sin la pareja adecuada en el interior hidrofóbico de la proteína puede ser tan *desestabilizante* que las conformaciones que los contienen son a menudo imposibles de mantener termodinámicamente. La variación favorable de energía libre debido a la combinación de varios de estos grupos con otros de la disolución externa que los rodea puede ser mayor que la diferencia de energía libre entre los estados plegado y desplegado. Además, los enlaces de hidrógeno entre grupos de la proteína se forman cooperativamente (la formación de un enlace de hidrógeno facilita la formación de los siguientes) en estructuras secundarias repetitivas que optimizan el uso de los enlaces de hidrógeno, como veremos más adelante. De este modo, los enlaces de hidrógeno desempeñan a menudo un importante papel en la conducción del proceso de plegamiento.

La interacción entre grupos de carga opuesta que forman un par iónico, o puente salino, puede tener efectos estabilizantes o desestabilizantes sobre la estructura proteica. Como ocurre con los enlaces de hidrógeno, las cadenas laterales de los aminoácidos cargados interaccionan con el agua y las sales cuando la proteína está desplegada, por lo que debe considerarse la pérdida de estas interacciones al evaluar el efecto de un puente salino sobre la estabilidad global de una proteína plegada. Sin embargo, la fuerza de un puente salino incrementa al desplazarse hacia un entorno con menor constante dieléctrica, ε (véase la pág. 50): desde el disolvente polar acuoso (ε cercana a 80) hasta el interior no polar de la proteína (ε cercana a 4). Por tanto, los puentes salinos, en especial los que están parcial o completamente ocultos en el interior, pueden aportar una estabilización significativa a la estructura de una proteína. Ello explica el incremento en el número de puentes salinos interiorizados en las proteínas de organismos termofílicos. Las interacciones iónicas también limitan la flexibilidad estructural, confiriendo a la estructura proteica una individualidad que no pueden proporcionar las interacciones hidrofóbicas no específicas.

En el entorno atómico altamente empaquetado de una proteína, otro tipo de interacciones débiles puede producir un efecto significativo, las interacciones de van der Waals. Las interacciones de van der Waals son del tipo dipolo-dipolo, entre los que se cuentan dipolos eléctricos permanentes en grupos tales como el carbonilo, dipolos transitorios derivados de las fluctuaciones de la nube electrónica que rodea los átomos y dipolos inducidos por la interacción de un átomo con otro que posee un dipolo permanente o transitorio. Al aproximarse los átomos, estas interacciones dipolo-dipolo generan una fuerza atractiva intermolecular que opera tan sólo dentro de una distancia corta (0,3 a 0,6 nm). Las interacciones individuales de van der Waals, al ser débiles, contribuyen poco a la estabilidad global de la proteína. Sin embargo, el número de estas interacciones puede ser muy sustancial en una proteína bien empaquetada o en una interacción entre una proteína y otra proteína u otra molécula con una superficie complementaria.

La mayor parte de los modelos estructurales esbozados a lo largo de este capítulo son reflejo de dos reglas simples: (1) los residuos hidrofóbicos se encuentran sepultados en el interior de la proteína, lejos del contacto con el agua, y (2) en el interior de la proteína se maximiza el número de enlaces de hidrógeno y de interacciones iónicas, lo que reduce el número de grupos no apareados capaces de formar enlaces de hidrógeno o enlaces iónicos con otro grupo adecuado. Las proteínas que se localizan en membranas (analizadas en el Capítulo 11) y las intrínsecamente desordenadas o que poseen segmentos intrínsecamente desordenados



Linus Pauling, 1901-1994
[Fuente: Nancy R. Schiff/Getty Images.]



Robert Corey, 1897-1971
[Fuente: Cortesía de los Archivos del California Institute of Technology.]

siguen reglas diferentes. Esto es un reflejo de su función particular o de su entorno, pero las interacciones débiles siguen siendo elementos estructurales críticos. Por ejemplo, los segmentos de proteínas solubles aunque intrínsecamente desordenados son ricos en aminoácidos con cadena lateral cargada (en especial Arg, Lys o Glu) o pequeños (Gly, Ala), lo que deja pocas o nulas oportunidades a la formación de un núcleo hidrofóbico estable.

El enlace peptídico es plano y rígido

Los enlaces covalentes también imponen límites importantes a las posibles conformaciones de un polipéptido. A finales de la década de 1930, Linus Pauling y Robert Corey iniciaron una serie de estudios que sentaron las bases de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura proteica. Empezaron con un análisis cuidadoso del enlace peptídico.

Los carbonos α de residuos aminoácidos adyacentes se encuentran separados por tres enlaces covalentes, ordenados así: C_α—C—N—C_α. Los estudios de difracción de rayos X de cristales de aminoácidos y de dipéptidos y tripéptidos sencillos demostraron que el enlace peptídico C—N es ligeramente más corto que el enlace C—N de una amina simple y que los átomos asociados con el enlace son coplanares. Esto indicaba la existencia de una resonancia, es decir, que el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amida compartían parcialmente dos pares de electrones **(Fig. 4-2a)**. El oxígeno tiene una carga negativa parcial y el hidrógeno unido al nitrógeno una carga neta positiva parcial, formando un pequeño dipolo eléctrico. Los seis átomos del **grupo peptídico** se encuentran en el mismo plano, con el átomo de oxígeno del grupo carbonílico en posición trans respecto al átomo de hidrógeno del nitrógeno amida. A partir de estos descubrimientos, Pauling y Corey dedujeron que los enlaces peptídicos C—N no pueden girar libremente

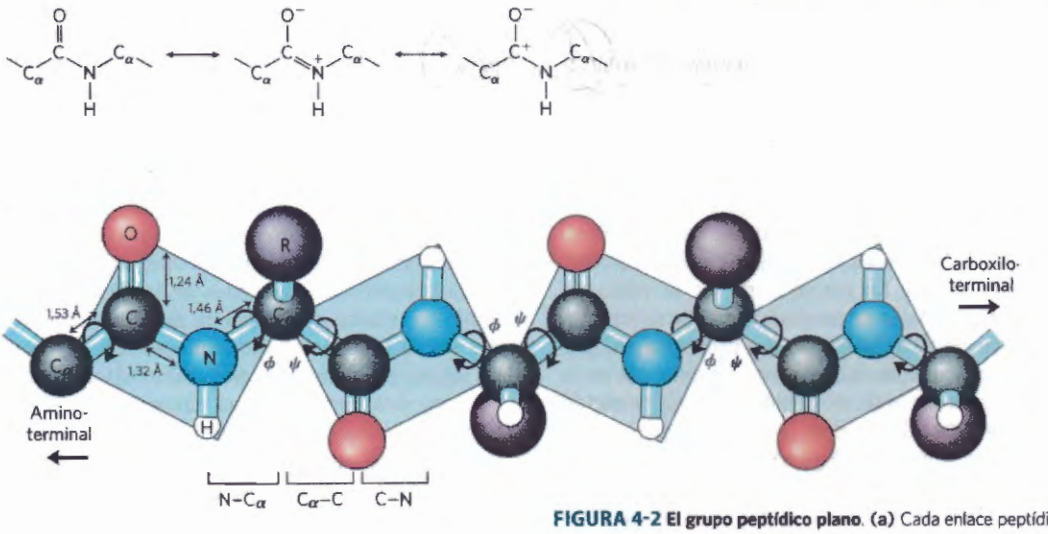


FIGURA 4-2 El grupo peptídico plano. (a) Cada enlace peptídico tiene carácter parcial de doble enlace debido a la resonancia, y no puede girar. A pesar de que se suele representar el átomo de N de un enlace peptídico con un carga parcial positiva, un análisis cuidadoso de los orbitales enlazantes mediante mecánica cuántica indica que el N tiene una carga neta neutra o ligeramente negativa. **(b)** Tres enlaces separan los carbonos α secuencialmente consecutivos en una cadena polipeptídica. Los enlaces N—C_α y C_α—C pueden rotar, y sus ángulos de enlace se denominan ϕ y ψ, respectivamente. El enlace peptídico C—N no puede rotar libremente. Otros enlaces sencillos de la cadena principal pueden tener también impedida la rotación, según el tamaño y carga de los grupos R. **(c)** Átomos y planos que describen ψ. **(d)** Por convención, se considera que los ángulos ϕ y ψ tienen un valor de 180° (o -180°) cuando el primer y cuarto átomos se encuentran lo más alejados posible y el péptido está completamente extendido. Si el observador mira en la dirección del enlace que rota (en cualquier dirección) los ángulos ϕ y ψ aumentan cuando el cuarto átomo gira en el sentido de las agujas del reloj con relación al primero. En las proteínas, algunas de las conformaciones aquí mostradas (p.ej. 0°) están prohibidas a causa de impedimentos estéricos entre átomos. De (b) a (d), las esferas que representan átomos son más pequeñas que el radio de van der Waals a esta escala.

a causa de su carácter parcial de doble enlace. La rotación es posible alrededor de los enlaces N—C_α y C_α—C. El esqueleto polipeptídico de una proteína puede visualizarse, por tanto, como una serie de planos rígidos en la que los planos consecutivos comparten un punto común de giro alrededor de C_α (Fig. 4-2b). La rigidez de los enlaces peptídicos limita el número de conformaciones que puede adoptar una cadena polipeptídica.

La conformación de un péptido está definida por tres ángulos diedros (también conocidos como ángulos de torsión) denominados ϕ (fi), ψ (psi) y ω (omega), que describen la rotación alrededor de cada uno de los tres enlaces repetidos en la cadena principal. Un ángulo diedro es el ángulo formado por la intersección de dos planos. En el caso de los péptidos, los planos se definen por los vectores de enlace de la cadena principal. Dos vectores de enlace sucesivos describen un plano. Tres vectores de enlace sucesivos describen dos planos (el vector de enlace central es común a los dos; Fig. 4-2c), y el ángulo entre los dos planos es lo que medimos para describir la conformación de la proteína.

» **Convención clave:** Los importantes ángulos diedros de un péptido se definen mediante tres vectores de enlace que conectan cuatro átomos consecutivos de la cadena principal (esqueleto polipeptídico) (Fig. 4-2c): ϕ incluye los enlaces C—N—C_α—C (la rotación tiene lugar alrededor del enlace N—C_α), mientras que ψ incluye los enlaces N—C_α—C—N. Tanto ϕ como ψ tienen, por convención, valores de ±180° cuando el polipéptido se halla completamente extendido y todos los grupos peptídicos se encuentran en el mismo plano (Fig. 4-2d). Al mirar en la dirección del vector del enlace central en la dirección de la flecha del vector (como se ve en la Fig. 4-2c para el caso de ψ), los ángulos diedros aumentan al rotar el átomo distal (el cuarto) en el sentido de las agujas del reloj (Fig. 4-2d). Desde la posición de ±180°, el ángulo diedro aumenta desde -180° a 0°, en cuyo punto los átomos primero y cuarto se eclipsan. Continuando la rotación desde 0° a +180° (la misma posición que -180°) se llega a la misma estructura inicial. No se suele considerar el tercer ángulo diedro, ω. Éste incluye los enlaces C_α—C—N—C_α. En este caso el enlace central es el peptídico, cuya rotación está limitada. El enlace peptídico se encuentra normalmente (el 99,6% del tiempo) en la configuración trans, limitando el valor de ω a ±180°. El valor de ω es de 0° para el caso poco frecuente de un enlace peptídico en cis. «

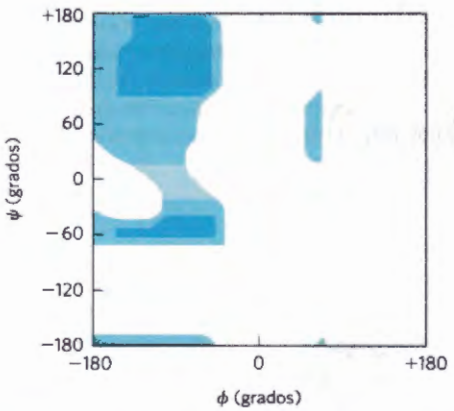


FIGURA 4-3 Representación de Ramachandran para los residuos de L-Ala. Las conformaciones de los péptidos se definen por los valores de ϕ y ψ. Basándose en cálculos en los que se utilizan radios de van der Waals y ángulos diedros conocidos, las conformaciones consideradas posibles son las que implican poca, o ninguna, interferencia estérica. Las áreas sombreadas en azul oscuro reflejan conformaciones que no implican solapamiento estérico si los radios de van der Waals de los átomos se modelan como una esfera dura y, por tanto, están totalmente permitidas; el azul de intensidad media indica conformaciones permitidas si se admite una aproximación adicional entre átomos de 0,1 nm, un choque tolerable; el área azul claro indica conformaciones posibles si se permite cierta flexibilidad (unos pocos grados) en el ángulo diedro ω que describe el enlace peptídico (generalmente fijado en 180°). Las regiones en blanco representan conformaciones no permitidas. La estereoquímica de los residuos L-aminoácidos origina la asimetría de la representación. Las representaciones para otros residuos aminoácidos no ramificados de la serie L son prácticamente idénticas. Los márgenes permitidos para los residuos aminoácidos ramificados tales como Val, Ile y Thr son algo más pequeños que para Ala. El residuo Gly, el que tiene menos impedimentos estéricos, presenta un margen mucho más amplio de conformaciones permitidas. El margen para los residuos Pro está muy restringido debido a que el valor de ϕ está limitado por su cadena lateral cíclica a un margen entre -35° a -85°. [Fuente: Información de T.E. Creighton, Proteins, p. 166 © 1984 de W.H. Freeman and Company. Reimpreso con permiso.]

En principio, ϕ y ψ pueden adoptar cualquier valor entre -180° y +180°, pero muchos de estos valores no son accesibles a causa de las interferencias estéricas entre átomos del esqueleto polipeptídico y de las cadenas laterales de los aminoácidos. Por esta razón, la conformación en la que ϕ y ψ valen 0 es una de las inaccesibles (Fig. 4-2d); este valor se usa meramente como punto de referencia para describir los ángulos diedros. Los valores permitidos para ϕ y ψ pueden visualizarse gráficamente representando ψ frente a ϕ, en la que se denomina **representación de Ramachandran (Fig. 4-3)**, introducida por G.N. Ramachandran. Veremos que las representaciones de Ramachandran son herramientas muy útiles que se usan frecuentemente para comprobar la calidad de las estructuras tridimensionales de las proteínas depositadas en los bancos de datos internacionales.

RESUMEN 4.1 Visión general de la estructura de las proteínas

- Toda proteína posee una o más estructuras tridimensionales, o conformaciones, que son un reflejo de su función. Algunas proteínas tienen segmentos intrínsecamente desordenados.
- La estructura proteica está estabilizada en su mayor parte por múltiples interacciones débiles. El efecto hidrofóbico, derivado del incremento de entropía del agua circundante cuando se agrupan moléculas o grupos apolares, son las que más contribuyen en la estabilización de la forma globular de la mayoría de proteínas solubles. También contribuyen la interacciones de van der Waals. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas están optimizadas en las estructuras más estables termodinámicamente.
- Los enlaces covalentes no peptídicos, especialmente los enlaces disulfuro, contribuyen a la estabilización de la estructura de algunas proteínas.
- La naturaleza de los enlaces covalentes en el esqueleto polipeptídico impone limitaciones en la estructura.

El enlace peptídico tiene un carácter de doble enlace parcial que mantiene a los seis átomos del grupo peptídico en una configuración plana rígida. Los enlaces N—C→ y C_α—C pueden rotar asumiendo, respectivamente, diversos valores en los ángulos ϕ y ψ.

■ La representación de Ramachandran es una descripción visual de las combinaciones de los ángulos diedros ϕ y yque están permitidos en una cadena peptídica o que no lo están debido a impedimentos estéricos.

4.2 Estructura secundaria de las proteínas

El término **estructura secundaria** se refiere a cualquier segmento de una cadena polipeptídica y describe la distribución espacial local de los átomos de su cadena principal, sin tener en cuenta la conformación de sus cadenas laterales ni su relación con otros segmentos. Una estructura secundaria se considera *regular* cuando todos los ángulos diedros ϕ y ψ adoptan valores iguales en todo el segmento. Existe un número limitado de estructuras secundarias que son particularmente estables y que se encuentran ampliamente distribuidas en las proteínas. Las más destacables son las conformaciones en hélice α y β; otra muy habitual recibe el nombre de giro β. Allí donde no se observa una estructura regular, la estructura se suele describir como indefinida o como estructura al azar. Sin embargo, esta última denominación no describe correctamente la estructura de estos segmentos. En la mayoría de proteínas el camino que sigue una cadena polipeptídica no es al azar, sino que es constante y altamente específica en relación con la estructura y función de cada proteína. Nuestra discusión se centrará en las estructuras regulares más frecuentes.

La hélice α es una estructura secundaria habitual en proteínas

Pauling y Corey eran conscientes de la importancia de los enlaces de hidrógeno en la orientación de los grupos químicos polares tales como el C=O y el N—H del enlace peptídico. Eran también conocedores de los resultados experimentales de William Astbury quien, en la década de 1930, había llevado a cabo un trabajo pionero sobre las proteínas con rayos X. Astbury demostró que la proteína que constituye las púas del puerco espín y el cabello (la proteína fibrosa α-queratina) posee una estructura regular que se repite cada 5,15 a 5,2 Å. (El angstrom, Å, nombre debido al físico Anders J. Ångström, es igual a 0,1 nm. Aunque no es una unidad del Sistema Internacional (SI), es utilizada universalmente por los biólogos estructurales para describir distancias atómicas ya que equivale aproximadamente a la longitud de un enlace C—H típico.) Con esta información y sus datos acerca del enlace peptídico, y con la ayuda de modelos moleculares precisos, Pauling y Corey se propusieron determinar cuáles eran las conformaciones más probables de las moléculas de proteína.

El primer avance importante llegó en 1948. Pauling era entonces profesor visitante en la Universidad de Oxford; cayó enfermo y se retiró a su apartamento para tomarse unos días de descanso. Aburrido porque no encontraba lecturas estimulantes, cogió papel y lápiz para trabajar en algún modelo plausible de la estructura que podría adoptar una cadena polipeptídica. El modelo desa-

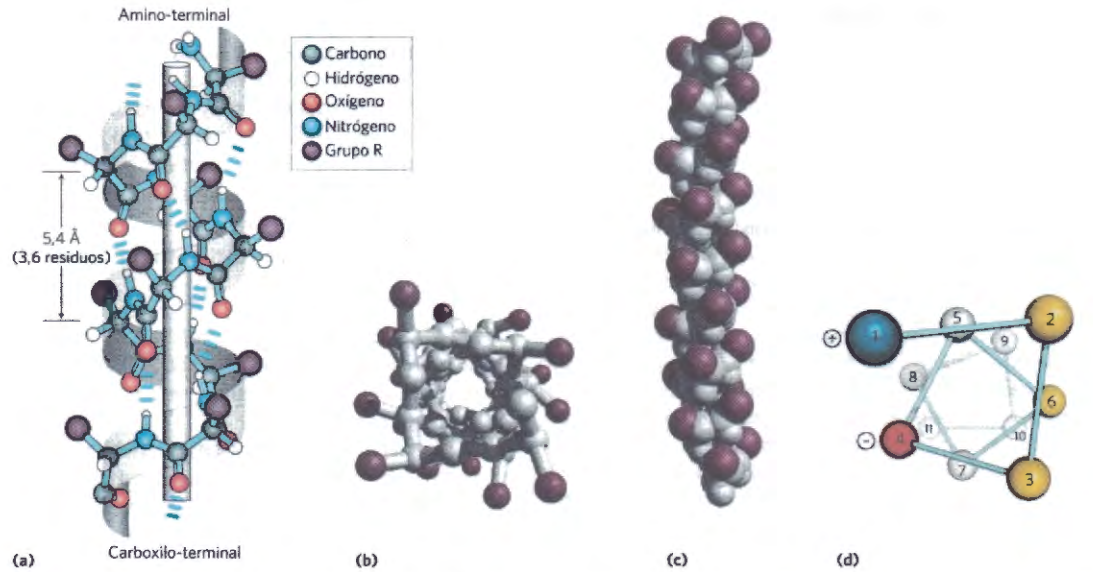


FIGURA 4-4 Modelos de hélice α que muestran aspectos diferentes de su estructura. **(a)** Modelo de esferas y varillas en el que se muestran los enlaces de hidrógeno intracatenarios. La unidad repetitiva es una vuelta de hélice, de 3,6 residuos. **(b)** La hélice α vista desde un extremo a lo largo del eje longitudinal (obtenida a partir de PDB ID 4TNC). Obsérvense las posiciones de los grupos R, representados por esferas púrpura. Este modelo de bolas y varillas, que resalta la disposición helicoidal, da la falsa impresión de que la hélice está hueca porque las esferas no representan los radios de van der Waals de los átomos individuales. **(c)** Como muestra el modelo de esferas de van der Waals, los átomos en el centro de la hélice α están en contacto muy cercano. **(d)** Proyección de rueda helicoidal de una hélice α. En esta representación se utilizan colores para identificar superficies con propiedades particulares. Los residuos amarillos, por ejemplo, podrían ser hidrofóbicos y adecuarse a la posible interfase entre esta hélice y otra parte del mismo o de otro polipéptido. Los residuos en rojo (negativos) y azul (positivos) ilustran el potencial de interacción entre cadenas laterales de carga opuesta cuando están separadas por dos residuos de la hélice. [Fuente: (b, c) derivados de PDB ID 4TNC, K.A. Satyshur et al., *J. Biol. Chem.* 263:1628, 1988.]

TABLA 4-1 Ángulos ϕ y ψ ideales de las estructuras secundarias comunes de proteína

Estructura	ϕ	ψ
Hélice α	−57°	−47°
Conformación β		
Antiparalela	−139°	+135
Paralela	−119°	+113°
Triple hélice del colágeno	−51°	+153°
Giro β tipo I		
i + 1[a]	−60°	−30°
i + 2[a]	−90°	0°
Giro β tipo II		
i + 1	−60°	+120°
i + 2	+80°	+0°

Nota: a menudo, en proteínas reales los ángulos diedros varían ligeramente respecto a los valores ideales aquí expresados.

[a]Los ángulos i+1 e i+2 son los del segundo y tercer residuos aminoácidos del giro β, respectivamente.

rrollado, que más tarde confirmaría conjuntamente con Corey y con su colega Herman Branson, era la disposición más simple adoptada por la cadena polipeptídica capaz de maximizar el uso de enlaces de hidrógeno internos. Ésta es una estructura en hélice, a la que Pauling y Corey denominaron **hélice α (Fig. 4-4)**. En esta estructura el esqueleto polipeptídico se encuentra fuertemente enrollado alrededor del eje longitudinal imaginario de la molécula, y los grupos R de los residuos aminoácidos sobresalen del esqueleto helicoidal hacia el exterior. La unidad repetitiva es un giro de hélice, que se extiende 5,4 Å a lo largo del eje longitudinal, ligeramente superior a la periodicidad observada por Astbury en su análisis de la queratina del cabello por rayos X. Los átomos de los residuos aminoácidos de la cadena principal de una hélice α típica presentan una pareja característica de ángulos diedros que definen la conformación en hélice α (Tabla 4-1), y cada giro de la hélice incluye 3,6 residuos aminoácidos. Los segmentos α-helicoidales de las proteínas a menudo suelen desviarse ligeramente de estos valores de los ángulos diedros, que incluso varían algo dentro de un mismo segmento continuo, generando pequeñas curvaturas o dobleces en el eje de la hélice. Pauling y Corey consideraron las variantes dextrógira y levógira de la hélice α. La elucidación posterior de la estructura tridimensional de la mioglobina y de otras proteínas demostró que la hélice α dextrógira es la forma habitual (Recuadro 4-1). Las hélices α levógiras largas son teóricamente menos estables y no han sido observadas en proteínas. La estructura predominante en α-queratinas es la hélice α. De modo más general, en las proteínas globulares se observa que aproximadamente una cuarta parte de todos los residuos aminoácidos se encuentra formando hélices α, aunque la proporción exacta varía mucho de una proteína a otra.

¿Cuál es la razón de que se forme la hélice α con más facilidad que otras conformaciones posibles? La respuesta se encuentra, en parte, en el uso óptimo de los puentes de hidrógeno internos. La estructura se encuentra estabilizada por un enlace de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno electronegativo de un enlace peptídico y el átomo de oxígeno carbonílico electronegativo del cuarto aminoácido que se encuentra en el lado amino-terminal del enlace peptídico (Fig. 4-4a). Cada uno de los enlaces peptídicos de la hélice α (excepto los que están próximos a cada extremo) participa en esta trama de enlaces de hidrógeno. Cada vuelta sucesiva de la hélice α se mantiene unida a las vueltas adyacentes mediante tres o cuatro enlaces de hidrógeno que, sumados, proporcionan a la estructura una estabilidad considerable. Siempre hay tres o cuatro grupos carbonilo o amino en los extremos de un segmento de hélice α que no pueden participar en la trama helicoidal de enlaces de hidrógeno. Estos grupos pueden hallarse expuestos al disolvente, donde forman enlaces de hidrógeno con el agua, o bien encontrarse protegidos por otras partes de la proteína que pueden proporcionar grupos complementarios para la formación de los enlaces de hidrógeno.

Experimentos posteriores han demostrado que una hélice α se puede formar en polipéptidos consistentes tanto en L- como en D-aminoácidos. Sin embargo, todos los residuos deben pertenecer a la misma serie de estereoisómeros; un D-aminoácido rompería una estructura regular constituida por L-aminoácidos y viceversa. La forma más estable de una hélice α formada por D-aminoácidos es la levógira.

RECUADRO 4-1 METODOS Cómo distinguir la mano derecha de la izquierda

Existe un método sencillo para determinar el sentido de giro de una estructura helicoidal. Cierre los puños dejando el pulgar estirado y dirigido hacia arriba. Observando su mano derecha, imagine una hélice que se prolonga en la dirección indicada por el pulgar y con su espiral girando en el sentido en que se pliegan los otros cuatro dedos (el de las agujas del reloj). La hélice resultante es dextrógira. La repetición del proceso con la mano izquierda proporcionará la imagen de la hélice levógira, que gira en dirección en el sentido contrario al de las agujas del reloj si la hélice se prolonga en la dirección del pulgar.

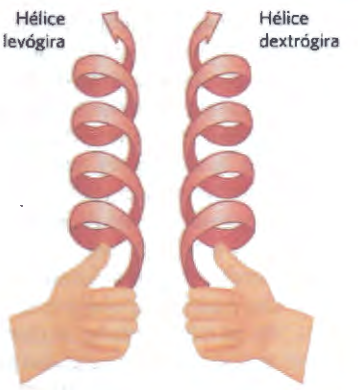


TABLA 4-2 Tendencia de los aminoácidos a adoptar la conformación en hélice α

Aminoácido	$\Delta\Delta G°$ (kJ/mol)[a]	Amino acid	$\Delta\Delta G°$ (kJ/mol)[a]
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2,0
Cys	3	Pro	>4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	4,6	Tyr	2,0
His	2,6	Trp	2,0
Ile	1,4	Val	2,1

Fuentes: Los datos (excepto prolina) están extraídos de J.W. Bryson et al., *Science* 270:935, 1995. Los datos de prolina de J.K. Myers et al., *Biochemistry* 36: 10,923, 1997.

[a] $\Delta\Delta G°$ es la diferencia en la variación de energía libre, relativa al valor de la alanina, necesaria para que el residuo aminoácido adquiera la conformación en hélice α. Los valores mayores reflejan una mayor dificultad para adoptar esta estructura. Los datos son el resumen de múltiples experimentos y sistemas experimentales.

EJEMPLO PRÁCTICO 4-1 Estructura secundaria y dimensiones de las proteínas

¿Cuál es la longitud de una cadena polipeptídica de 80 residuos aminoácidos formando una única hélice α continua?

Solución: Una hélice α ideal tiene 3,6 residuos per vuelta y el desplazamiento por vuelta a lo largo del eje de la hélice es de 5,4 Å. Por lo tanto, el avance por residuo es de 1,5 Å. La longitud del polipéptido es, por consiguiente, de 80 residuos x 1,5 Å/residuo = 120 Å.

La secuencia de aminoácidos afecta a la estabilidad de la hélice α

No todos los polipéptidos pueden formar una hélice α estable. Cada residuo aminoácido de un polipéptido tiene una tendencia intrínseca a formar hélice α (Tabla 4-2), lo que refleja las propiedades del grupo R y el modo en que éstas afectan la capacidad de los átomos de cadena principal colindantes para adaptarse a los valores característicos de los ángulos ϕ y ψ. La alanina es la que muestra la mayor tendencia a formar hélices α en la mayoría de modelos experimentales.

La posición de un residuo aminoácido con respecto a sus vecinos es también importante. Las interacciones entre cadenas laterales de aminoácidos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura helicoidal. Por ejemplo, si una cadena polipeptídica posee muchos residuos Glu consecutivos, este segmento de la cadena no podrá formar una hélice α a pH 7,0. Los grupos carboxílicos cargados negativamente de los residuos Glu adyacentes se repelen con una intensidad que impide la formación de la hélice α. Por la misma razón, si muchos residuos Lys y/o Arg, con grupos polares cargados positivamente a pH 7,0 están situados consecutivamente, también se repelerán e impedirán la formación de la hélice α. El tamaño y la forma de los residuos Asn, Ser, Thr y Cys también pueden desestabilizar la hélice α si se hallan muy cercanos en la cadena.

El giro de una hélice α asegura la existencia de interacciones críticas entre la cadena lateral de un aminoácido y la cadena lateral que se encuentra tres (o a veces cuatro) aminoácidos separada de ella en cualquiera de las dos direcciones. Esto queda claro observando la hélice α como una rueda helicoidal (Fig. 4-4d). Los aminoácidos cargados positivamente se encuentran a menudo a tres residuos de distancia de aminoácidos cargados negativamente, lo que permite la formación de interacciones iónicas. A menudo se observa también un espaciamiento similar en el caso de dos aminoácidos aromáticos, lo que da lugar a una interacción hidrofóbica.

Una de las restricciones a la formación de la hélice α es la presencia de residuos Pro o Gly, que son los menos proclives a formarla. En la prolina, el átomo de nitrógeno forma parte de un anillo rígido (Fig. 4-8), y la rotación alrededor del enlace N—C_α no es posible. Así, un residuo Pro introduce una torsión desestabilizante en la hélice α. Además, el átomo de nitrógeno de un residuo Pro en un enlace peptídico no contiene ningún átomo de hidrógeno que pueda formar enlaces de hidrógeno con otros residuos. Por estas razones es rara la presencia de prolina en las hélices α. La razón de que raramente se encuentre glicina en las hélices α es diferente: tiene más flexibilidad conformacional que otros residuos aminoácidos. Los polímeros de glicina tienden a formar estructuras arrolladas totalmente diferentes de las hélices α.

Finalmente, otro factor que afecta a la estabilidad de una hélice α es la identidad de los residuos aminoácidos localizados cerca de los extremos del fragmento α-helicoidal. En cada enlace peptídico existe un pequeño dipolo eléctrico (Fig. 4-2a). Estos dipolos están conectados a través de los enlaces de hidrógeno de la hélice, de manera que el dipolo neto aumenta con la longitud de la hélice **(Fig. 4-5)**. Las cargas parciales positiva y negativa del dipolo de la hélice residen en los grupos amino y carbonilo del enlace peptídico situado cerca de los



FIGURA 4-5 Dipolo de la hélice. El dipolo eléctrico de un enlace peptídico (véase la Fig. 4-2a) se transmite a lo largo de un segmento en hélice α a través de enlaces de hidrógeno intracatenarios, dando como resultado un dipolo global en la hélice. En esta ilustración los constituyentes amino y carbonilo de cada enlace peptídico se indican por símbolos + y - respectivamente. Los grupos amino y carbonilo del enlace peptídico no enlazados por enlace de hidrógeno y situados cerca de los extremos de la región en hélice α se hallan dentro de un círculo y se muestran en color.

extremos amino-terminal y carboxilo terminal de la hélice, respectivamente. Por esta razón a menudo se observan aminoácidos cargados negativamente cerca del extremo amino-terminal del segmento helicoidal, donde ejercen una interacción estabilizadora con la carga positiva del dipolo de la hélice; un aminoácido cargado positivamente situado en el extremo amino-terminal es desestabilizante. Lo contrario es también cierto para el extremo carboxilo-terminal del segmento helicoidal.

En resumen, existen cinco tipos de restricciones diferentes que afectan a la estabilidad de una hélice α: (1) la tendencia intrínseca de cada residuo aminoácido a formar hélice v; (2) las interacciones entre grupos R, en especial los que se encuentran a tres (o cuatro) residuos de distancia; (3) el volumen de los grupos R adyacentes; (4) la presencia de residuos Pro y Gly; y (5) las interacciones entre residuos aminoácidos en los extremos del segmento helicoidal y el dipolo eléctrico inherente a la hélice α. Por consiguiente, la tendencia de un segmento determinado de una cadena polipeptídica a plegarse en hélice α depende de la identidad y de la secuencia de residuos aminoácidos en el segmento.

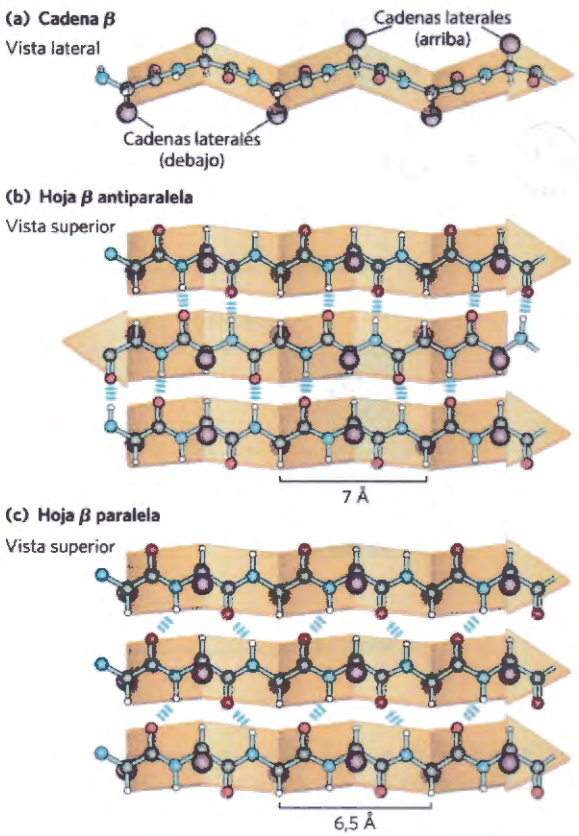


FIGURA 4-6 La conformación β en cadenas polipeptídicas. En estas vistas **(a)** lateral y **(b, c)** superior revelan que los grupos R se dirigen hacia el exterior de la hoja β y se pone de relieve el plegamiento de la hoja descrito por los planos de los enlaces peptídicos. (Un nombre alternativo para esta estructura es hoja β plegada.) También se muestran los enlaces por puente de hidrógeno entre cadenas adyacentes. La orientación amino-terminal a carboxilo-terminal de las cadenas adyacentes (flechas) puede ser la misma o la opuesta, formando (b) una hoja β antiparalela o (c) una hoja β paralela.

La conformación β organiza las cadenas polipeptídicas en forma de hoja

En 1951, Pauling y Corey predijeron un segundo tipo de estructura repetitiva, la **conformación β**. Esta es una conformación más extendida de las cadenas polipeptídicas y su estructura se define también mediante la disposición regular de sus átomos de cadena principal en base a unos valores característicos de los ángulos diedros (Tabla 4-1). En la conformación β el esqueleto de la cadena polipeptídica se encuentra extendido en zig-zag en lugar de plegarse como una hélice **(Fig. 4-6)**. La disposición lateral contigua de varios fragmentos, todos ellos en conformación β, se denomina **hoja β**. La estructura en zig-zag de los segmentos polipeptídicos individuales da lugar al aspecto plegado de la hoja formada. Dentro de esta hoja, se forman enlaces de hidrógeno entre segmentos adyacentes de cadena polipeptídica. A pesar de que los segmentos individuales suelen encontrarse cercanos en la secuencia, en ocasiones pueden estar a bastante distancia e incluso pueden pertenecer a cadenas polipeptídicas diferentes. Los grupos R de aminoácidos adyacentes sobresalen de la estructura en zig-zag en direcciones opuestas, dando lugar a un patrón alternante tal como se observa en la vista lateral de la Fig. 4-6.

Las cadenas polipeptídicas adyacentes de una hoja β pueden ser paralelas o antiparalelas (con la misma orientación amino-carboxilo o la opuesta, respectivamente). Las estructuras tienen cierta similitud, aunque el período de repetición es más corto en la conformación paralela (6,5 Å, en comparación con los 7 Å de la antiparalela) y los patrones de formación de puentes de hidrógeno son diferentes. Los enlaces de hidrógeno intercatenarios son esencialmente lineales en la hoja β antiparalela (véase la Fig. 2-5), mientras que presentan una ligera distorsión o no son lineales en la variante paralela. Las estructuras ideales presentan los ángulos de enlace de la Tabla 4-1; estos valores varían ligeramente en proteínas reales, dando lugar a variaciones estructurales como en el caso de las hélices α.

Los giros β son frecuentes en las proteínas

En las proteínas globulares, con una estructura de plegamiento compacta, algunos residuos aminoácidos están en giros o bucles donde la cadena polipeptídica cambia de dirección **(Fig.4-7)**. Estos son elementos de conexión que unen tramos sucesivos de hélices α o conformaciones β. Los **giros β** que conectan los extremos adyacentes de dos segmentos adyacentes de hojas β antiparalelas son especialmente frecuentes. Esta estructura forma un giro cerrado de 180° en el que están involucrados cuatro residuos aminoácidos, con el oxígeno del carbonilo del primer residuo aminoácido formando un enlace de hidrógeno con el hidrógeno del grupo amino del cuarto. Los grupos peptídicos de los dos residuos centrales no participan en ningún enlace de hidrógeno interresidual. Se han descrito varios tipos de giros β, cada uno definido por sus correspondientes valores de los ángulos ϕ y ψ en los enlaces que unen los cuatro aminoácidos de cada giro particular (Tabla 4-1). A menudo se encuentran residuos de Gly y Pro en los giros β. En el caso de la glicina ello es debido a que es un residuo pequeño y flexible, mientras que en el caso de la prolina la razón estriba en la facilidad con que los

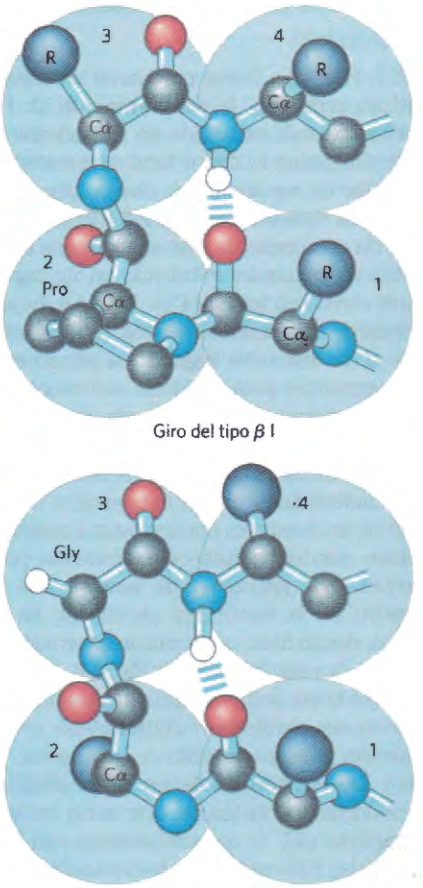


FIGURA 4-7 Estructura de los giros β. Los giros β del tipo I y tipo II son los más comunes y se distinguen por los ángulos ϕ y ψ adoptados por la cadena principal en el giro (véase la Tabla 4-1). Los giros de tipo I aparecen con una frecuencia superior al doble que el tipo II. El tercer residuo del giro β tipo II suele ser Gly. A pesar de que muchos residuos aminoácidos aparecen en estos giros, existen algunas claras preferencias. La Pro es el residuo más frecuente en la posición 2 de los giros tipo I, estando presente en aproximadamente un 16% de ellos. También la Pro es el residuo más frecuente en giros de tipo II, donde aparece en un 23% de las ocasiones. El sesgo más pronunciado corresponde a la presencia de Gly en la posición 3 de más del 75% de los giros de tipo II. Obsérvese el enlace de hidrógeno entre los grupos peptídicos de los residuos primero y cuarto del giro. (Los residuos de aminoácidos individuales están enmarcados por grandes círculos azules. En estas representaciones no se muestran todos los átomos de H.)

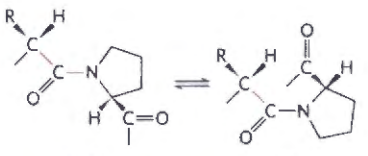


FIGURA 4-8 Isómeros trans y cis de un enlace peptídico con el nitrógeno imino de una prolina. Más del 99,95% de los enlaces peptídicos entre aminoácidos que no sean Pro se encuentran en la configuración trans. Sin embargo, aproximadamente un 6% de los enlaces peptídicos en los que interviene el nitrógeno imino de la prolina se encuentran en la configuración cis, y muchos de éstos se dan en los giros β.

enlaces peptídicos en los que participa el nitrógeno imino de la prolina adoptan la configuración cis **(Fig. 4-8)**, particularmente adecuada para la formación de un giro cerrado. Los dos tipos de giro β que se muestran en la Figura 4-7 son los más comunes. Los giros β se encuentran a menudo cerca de la superficie de las proteínas, donde los grupos peptídicos de los dos residuos aminoácidos centrales en el giro pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. Con menor frecuencia se presentan los giros γ, que constan de tres residuos con un enlace de hidrógeno entre el primero y el tercero.

Las estructuras secundarias comunes tienen ángulos diedros característicos

La hélice α y la conformación β son las estructuras secundarias repetitivas más importantes en gran número de proteínas, aunque existen otras estructuras repetitivas en algunas proteínas especializadas (un ejemplo es el colágе-

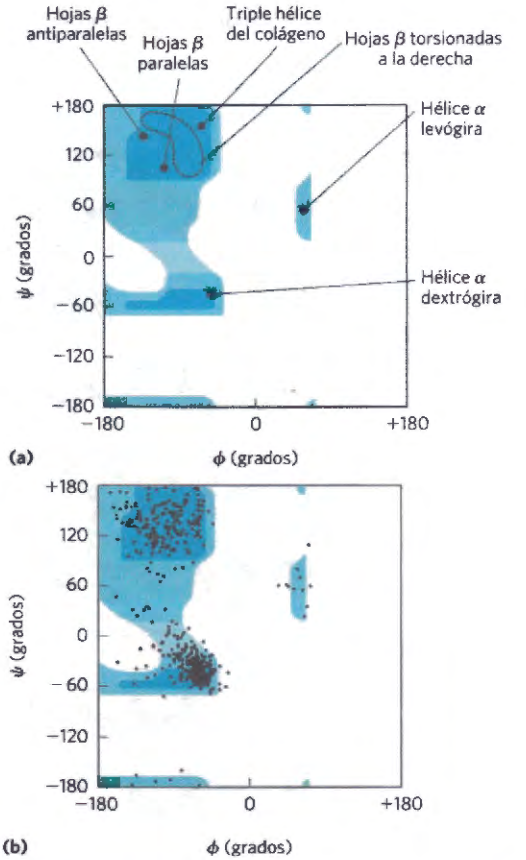


FIGURA 4-9 Representaciones de Ramachandran de diferentes estructuras. (a) Superposición de los valores de ϕ y ψ de diversas estructuras secundarias permitidas sobre la gráfica de la Figura 4-3. Aunque las hélices α levógiras de varios residuos aminoácidos son teóricamente posibles, no se han observado en proteínas. **(b)** Los valores de ϕ y ψ de todos los residuos aminoácidos con excepción de Gly del enzima piruvato quinasa (aislado de conejo) se superponen en la representación teórica de las conformaciones permitidas (Fig. 4-3). Se excluyeron los residuos de Gly pequeños y flexibles ya que frecuentemente caen fuera de los intervalos esperados (azul). [Fuentes: (a) Información de T.E. Creighton, Proteins, p. 166 © 1984 de W.H. Freeman and Company. (b) Cortesía de Hazel Holden, University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry.]

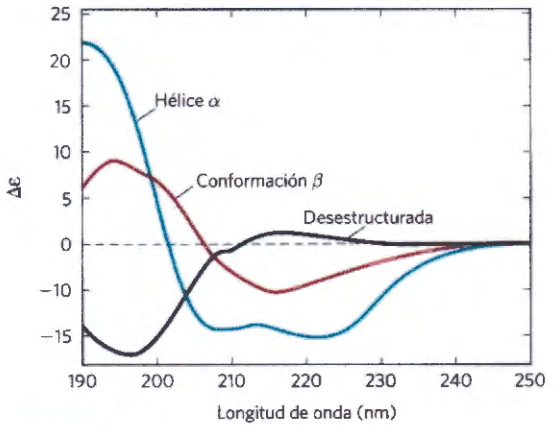


FIGURA 4-10 Espectroscopia de dicroísmo circular. Estos espectros muestran a la polilisina completamente en forma de hélice α, conformación β o como estructura desnaturalizada al azar. Las unidades del eje y son una versión simplificada de las unidades utilizadas más frecuentemente en los experimentos de CD. Puesto que las curvas son diferentes para la hélice α, la conformación β y la estructura al azar, el espectro de CD de una proteína determinada proporciona un cálculo grosero de la fracción de proteína que se encuentra en cada una de las dos estructuras secundarias más comunes. El espectro de CD de la proteína nativa puede servir como referencia del estado plegado, lo que resulta útil en el seguimiento de la desnaturalización o de los cambios conformacionales inducidos por las condiciones de la disolución.

no, véase la Fig. 4-13). Todas las estructuras secundarias pueden describirse por completo mediante los ángulos diedros ϕ y ψ asociados a cada residuo. Como puede observarse en la representación de Ramachandran, los ángulos diedros que definen la hélice α y la conformación β se encuentran dentro de la gama, relativamente restringida, de estructuras permitidas estéricamente **(Fig. 4-9a)**. La mayor parte de los valores de ϕ y ψ obtenidos de estructuras proteicas conocidas se encuentran dentro de las regiones esperadas, observándose altas concentraciones cerca de los valores correspondientes a la hélice α y la conformación β, tal como era de esperar (Fig. 4-9b). El único residuo aminoácido que se encuentra a menudo en una conformación que se halla fuera de las regiones mencionadas es la glicina. Gracias al pequeño tamaño de su cadena lateral de hidrógeno, un residuo de glicina puede adoptar muchas conformaciones que están estéricamente prohibidas para otros aminoácidos.

Las estructuras secundarias comunes pueden evaluarse mediante dicroísmo circular

Cualquier forma de asimetría estructural en una molécula da lugar a diferencias entre la absorción de la luz polarizada circularmente a la derecha y la polarizada a la izquierda. La técnica que mide esta diferencia se denomina **espectroscopia de dicroísmo circular (CD)**. Una estructura ordenada, tal como una proteína plegada, da lugar a un espectro de absorción que puede tener picos o regiones con valores positivos o negativos. Los espectros de proteínas se obtienen en la región del UV lejano (190 a 250 nm). En esta región, la entidad que absorbe la luz, el cromóforo, es el enlace peptídico; cuando el enlace peptídico se halla en un entorno plegado se obtiene una señal. La diferencia de los coeficientes de extinción molar (véase el Recuadro 3-1) de la luz polarizada en el plano a la derecha y a la izquierda ($\Delta\varepsilon$) se representa en función de la longitud de onda. Las conformaciones α y β tienen espectros de CD característicos **(Fig. 4-10)**. Mediante los espectros de CD, se puede determinar si las proteínas están correctamente plegadas, calcular la fracción de proteína que se encuentra plegada en una u otra estructura secundaria común y seguir las transiciones entre los estados plegado y desplegado.

RESUMEN 4.2 Estructura secundaria de proteínas

- La estructura secundaria es la disposición espacial local de los átomos de cadena principal en un determinado segmento de la cadena polipeptídica.
- Las estructuras secundarias regulares más comunes son la hélice α, la conformación β y los giros β.
- La estructura secundaria de un segmente polipeptídico puede definirse completamente si se conocen los valores de los ángulos ϕ y ψ de todos los aminoácidos del segmento.
- La espectroscopia de dicroísmo circular es un método útil para conocer la estructura secundaria y para seguir el plegamiento de proteínas.

4.3 Estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas

La disposición tridimensional global de todos los átomos de una proteína se conoce como **estructura terciaria**. Mientras que el término "estructura secundaria" se refiere al ordenamiento espacial de residuos aminoácidos adyacentes en un segmento de un polipéptido, la estructura terciaria incluye aspectos de *largo alcance* en la secuencia de aminoácidos. Aminoácidos que están alejados en la secuencia polipeptídica y que se encuentran en tipos de estructura secundaria diferentes pueden interaccionar dentro de la estructura totalmente plegada de la proteína. La localización de giros (incluidos los giros β) en la cadena polipeptídica y la dirección y el ángulo de estos giros están determinados por el número y la localización de aminoácidos específicos promotores de su formación, tales como Pro, Thr, Ser y Gly. Los segmentos que interaccionan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición terciaria característica gracias a diferentes tipos de interacciones enlazantes débiles (y a veces mediante enlaces covalentes tales como puentes disulfuro) entre los segmentos.

Algunas proteínas contienen dos o más cadenas polipeptídicas separadas, o subunidades, que pueden ser idénticas o diferentes. La disposición de estas subunidades proteicas en complejos tridimensionales constituye la **estructura cuaternaria**.

Al considerar estos niveles superiores de estructura, es de utilidad clasificar las proteínas en dos grupos principales: **proteínas fibrosas**, que presentan cadenas polipeptídicas dispuestas en largas hebras u hojas, y **proteínas globulares** con cadenas polipeptídicas plegadas en formas globulares o esféricas. Los dos grupos son estructuralmente diferentes: las proteínas fibrosas constan mayoritariamente de un único tipo de estructura secundaria y su estructura terciaria es relativamente simple. Las proteínas globulares contienen a menudo varios tipos de estructura secundaria. Los dos grupos también difie-

TABLA 4-3 Estructuras secundarias y propiedades de las proteínas fibrosas

Estructura	Características	Ejemplos
Hélice α, entrecruzada mediante enlaces disulfuro	Estructuras protectoras insolubles y resistentes, de dureza y flexibilidad variables	α-Queratina de cabello, plumas y uñas
Conformación β	Filamentos suaves y flexibles	Fibroína de la seda
Triple hélice del colágeno	Gran fuerza tensil, sin capacidad de estiramiento	Colágeno de los tendones, matriz ósea

ren en su función: las estructuras que dan soporte, forma y protección externa a los vertebrados están formadas por proteínas fibrosas mientras que la mayoría de enzimas y proteínas reguladoras son globulares.

Las proteínas fibrosas están adaptadas a una función estructural

La α-queratina, el colágeno y la fibroína de la seda son ejemplos claros de la relación entre estructura proteica y función biológica (Tabla 4-3). Las proteínas fibrosas comparten propiedades que confieren fuerza, flexibilidad, o las dos cosas a la vez, a las estructuras en las que se encuentran. En cada caso, la unidad estructural fundamental es la repetición de un elemento simple de estructura secundaria. Todas las proteínas fibrosas son insolubles en agua, una propiedad debida a la elevada concentración de residuos aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto en el interior como en la superficie de estas proteínas. Estas superficies hidrofóbicas se encuentran sepultadas en gran parte en el interior debido al empaquetamiento de muchas cadenas polipeptídicas similares para formar elaborados complejos supramoleculares. La simplicidad estructural subyacente en las proteínas fibrosas las hace especialmente útiles para ilustrar algunos de los principios fundamentales de la estructura de proteínas discutidos anteriormente.

α-Queratina. Las α-queratinas son proteínas que han evolucionado para poder soportar esfuerzos mecánicos. Presente sólo en los mamíferos, estas proteínas constituyen la práctica totalidad del peso seco de cabellos, lana, uñas, garras, cañones de las plumas, cuernos, pezuñas y gran parte de la capa externa de la piel. Las α-queratinas pertenecen a una familia más amplia de proteínas denominadas proteínas de los filamentos intermedios (FI). Otras proteínas de esta familia están localizadas en el citoesqueleto de las células animales. Todas las proteínas FI tienen una función estructural y comparten las características estructurales ejemplificadas por la α-queratinas.

La hélice de la α-queratina es la misma hélice α dextrógira que se observa también en otras muchas proteínas. A principios de la década de 1950 Francis Crick y Linus Pauling sugirieron independientemente que las hélices α de la queratina estaban dispuestas formando una superhélice o hélice superenrollada (coiled coil). Dos cadenas de α-queratina orientadas en paralelo (con los extremos amino en el mismo lado) se enrollan una sobre otra formando un enrollamiento superhelicoidal. La resistencia de la estructura está amplificada por el enrollamiento en superhélice, de modo muy similar a las cuerdas que se trenzan para formar una soga más resistente **(Fig. 4-11)**. La torsión del eje de una hélice α al formar la estructura superenrollada explica la discrepancia entre los 5,4 Å por vuelta predichos para una hélice α por Pauling y Corey y los

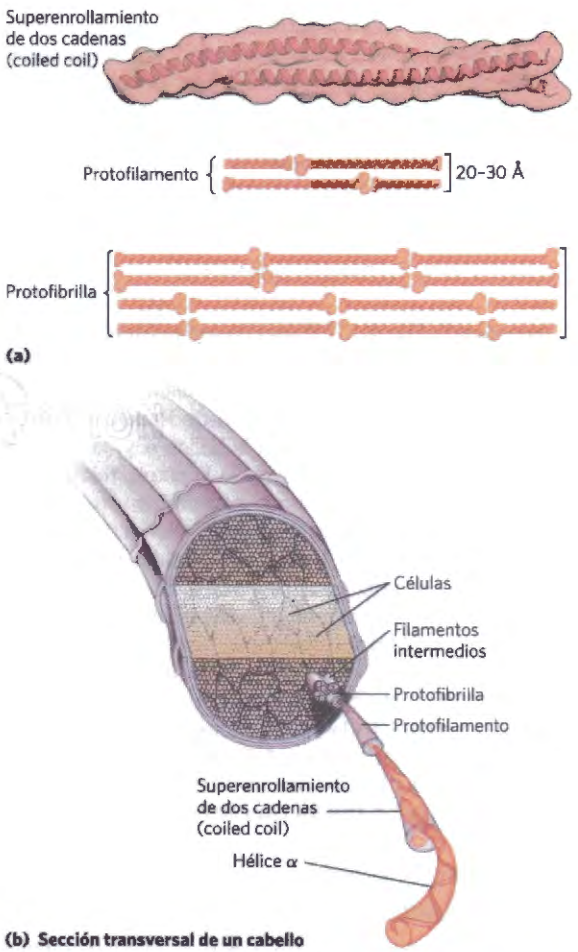
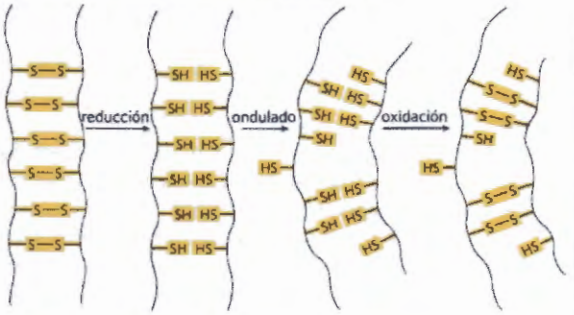


FIGURA 4-11 Estructura del cabello. (a) la α-queratina es una hélice α alargada que presenta elementos ligeramente más gruesos cerca de los extremos amino y carboxilo. Las hélices se enrollan entre ellas por parejas en sentido levógiro, formando superenrollamientos de dos cadenas. Éstas forman a su vez unas estructuras de orden superior denominadas protofilamentos y protofibrillas. Cerca de cuatro protofibrillas, 32 hebras de α-queratina en total; se combinan para formar un filamento intermedio. Las hélices superenrolladas de dos en dos cadenas presentes en las diversas subestructuras parecen estar también entrelazadas, pero se desconoce el sentido de este enrollamiento superior así como otros detalles estructurales. **(b)** Un cabello es una disposición de muchos filamentos de α-queratina, formados por subestructuras como las que se muestran en (a). [Fuente: (a) PDB ID 3TNU, C.H. Lee et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 19:707, 2012.]

RECUADRO 4-2 La ondulación permanente es un ejemplo de ingeniería bioquímica

El cabello se puede estirar cuando se expone al calor húmedo. A nivel molecular, las hélices α de la α-queratina del cabello se estiran hasta que llegan a adoptar una conformación β totalmente extendida. Al enfriarse revierten espontáneamente a la conformación de hélice α. Esta característica "estirabilidad" de las α-queratinas y su elevado contenido en enlaces disulfuro constituyen la base de la ondulación permanente. En primer lugar se da la forma deseada al cabello a ondular. A continuación se aplica, en caliente, una disolución de agente reductor, generalmente un compuesto que contiene un grupo tiol o sulfhidrilo (—SH). El agente reductor rompe los entrecruzamientos mediante la reducción de cada enlace disulfuro a dos residuos Cys. El calor húmedo rompe enlaces de hidrógeno y hace que la estructura α-helicoidal de las cadenas polipeptídicas se desenrolle. Después de transcurrido un cierto tiempo, se elimina la disolución de agente reductor y se añade un agente oxidante que estabiliza los enlaces disulfuro *nuevos* formados entre parejas de Cys de cadenas polipeptídicas adyacentes, y que no se corresponden ya con las anteriormente presentes. Después de lavar y enfriar el cabello, las cadenas polipeptídicas revierten a su conformación en hélice α. Así, el cabello queda ondulado del modo deseado puesto que los nuevos enlaces disulfuro formados ejercerán algún tipo de torsión y giro sobre los haces de hélices α de las fibras del cabello. Puede aplicarse el mismo proceso para estirar un cabello naturalmente ondulado. La ondulación permanente (o su estiramiento) no es realmente permanente debido a que el cabello crece; en el cabello nuevo que reemplaza al antiguo, la α-queratina presenta el patrón natural de enlaces disulfuro.



5,15 a 5,2 Å observados mediante difracción de rayos X en la estructura repetitiva del cabello. El enrollamiento superhelicoidal es levógiro, en sentido opuesto al de la hélice α. La superficie donde las dos hélices α entran en contacto está formada por residuos de aminoácidos hidrofóbicos y sus grupos R se engarzan entre ellos formando un patrón de entrecruzamiento regular lo que permite un empaquetamiento compacto de las cadenas polipeptídicas en la superhélice levógira. No es sorprendente que la α-queratina sea rica en los residuos hidrofóbicos Ala, Val, Leu, Ile, Met y Phe.

Un polipéptido individual de α-queratina superenrollada presenta una estructura terciaria relativamente simple, dominada por la estructura secundaria de la hélice v con su eje helicoidal adaptado a una superhélice levógira. El trenzado de los dos polipéptidos en hélice α es un ejemplo de estructura cuaternaria. Los superenrrollamientos de este tipo se presentan con frecuencia en los elementos estructurales de las proteínas filamentosas y en la proteína muscular miosina (véase la Fig. 5-27). La estructura cuaternaria de la α-queratina puede ser muy compleja. Muchas estructuras superenrrolladas pueden formar grandes complejos supramoleculares del mismo modo en que la α-queratina forma los filamentos intermedios del pelo (Fig. 4-11b).

La resistencia de las proteínas fibrosas se refuerza también gracias a entrecruzamientos covalentes entre las cadenas polipeptídicas que forman las "sogas" o "trenzas" de hélices múltiples y entre cadenas adyacentes de una superestructura molecular. En las α-queratinas los entrecruzamientos que estabilizan la estructura cuaternaria son enlaces disulfuro (Recuadro 4-2). En las α-queratinas más duras y resistentes, tales como las de los cuernos de rinoceronte, se observa que hasta un 18% de los residuos son cisteínas que forman puentes disulfuro.

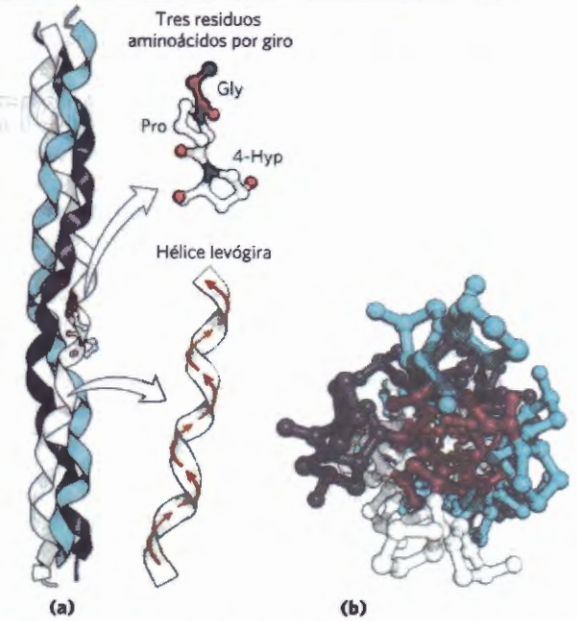


FIGURA 4-12 Estructura del colágeno. **(a)** La cadena α del colágeno tiene una estructura secundaria repetitiva que sólo se encuentra en esta proteína. La secuencia repetitiva tripeptídica Gly-X-Pro o Gly-X-4-Hyp adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. La secuencia repetitiva empleada para generar este modelo es Gly-Pro-4-Hyp. Tres de estas hélices (mostradas en color blanco, azul y púrpura) se enrollan entre ellas en sentido dextrógiro. **(b)** La superhélice de tres cadenas del colágeno vista desde un extremo, en una representación de bolas y varillas. Los residuos de glicina se representan en rojo. La glicina es necesaria en el lugar en que las tres cadenas entran en contacto debido a su pequeño tamaño. En esta ilustración las bolas no representan el radio de van der Waals de los átomos individuales. El centro de la superhélice de tres cadenas no está hueco como aquí aparece, sino que está firmemente empaquetado. [Fuente: Modificado de PDB ID 1CGD, J. Bella et al., *Structure* 3:893, 1995.]

RECUADRO 4-3 MEDICINA Razones por las que marinos, exploradores y estudiantes universitarios deben consumir fruta y verduras frescas

...con la mala fortuna de que, además de la insalubridad del país en el que no cae nunca una gota de agua, fuéramos atacados por una "enfermedad de campo" que hacía que la carne de nuestras extremidades se arrugara y que la piel de nuestras piernas quedara cubierta de manchas negras de aspecto mohoso, como una bota vieja, que las encías de los enfermos quedaran en carne viva; y ninguno escapó de la enfermedad si no era para caer en las garras de la muerte. La señal era ésta: cuando la nariz empezaba a sangrar, la muerte estaba próxima...

–Memorias de Lord of Joinville, *ca. 1300**

Este extracto describe la inquietante situación del ejército de Luís IX hacia el fin de la Séptima Cruzada (1248-1254), cuando el ejército de Cruzados, debilitado por el escorbuto, fue destruido por los egipcios. ¿Cuál era la naturaleza de la enfermedad que afectaba a los soldados del siglo XIII?

El escorbuto está causado por una deficiencia en vitamina C o ácido ascórbico (ascorbato). La vitamina C es necesaria para, entre otras cosas, la hidroxilación de prolinas y lisinas del colágeno; el escorbuto es una enfermedad carencial caracterizada por la degeneración general del tejido conjuntivo. Entre las manifestaciones del escorbuto en estado avanzado se incluyen numerosas pequeñas hemorragias debidas a la fragilidad de los vasos sanguíneos, pérdida de dientes, cicatrización deficiente de las heridas y reapertura de heridas antiguas, dolor y degeneración de huesos y, finalmente, paro cardíaco. En los casos más leves de carencia de vitamina C aparecen fatiga, irritabilidad y un aumento de la gravedad de las infecciones del tracto respiratorio. La mayoría de animales son capaces de sintetizar grandes cantidades de vitamina C mediante la conversión de glucosa en ascorbato a través de cuatro reacciones enzimáticas. Pero los seres humanos y algunos otros animales como gorilas, cobayas y murciélagos han perdido el último enzima de la vía a lo largo de la evolución y han de obtener su ascorbato de la dieta. La vitamina C se encuentra en muchas frutas y verduras. No obstante, y hasta el 1800, a menudo se encontraba ausente de los alimentos desecados o de otro tipo almacenados durante el invierno y durante viajes de larga duración.

El escorbuto fue observado por los egipcios en el 1500 a. C. y se encuentra descrito en los documentos de Hipócrates del siglo v a. C. Sin embargo, su existencia no fue conocida popularmente hasta la época de las navegaciones de los descubridores europeos entre 1500 y 1800. La primera circunnavegación de la tierra (1519-1522), comandada por Fernando de Magallanes, supuso la pérdida del 80% de la tripulación a causa del escorbuto. Durante el segundo viaje de Jacques Cartier para explorar el río San Lorenzo (1535-1536), su expedición sufrió numerosas bajas y estuvo amenazada de completo desastre hasta que los nativos americanos les enseñaron a elaborar el té de cedro que curaba y prevenía el escorbuto (contenía vitamina C). Los brotes de escorbuto invernales fueron desapareciendo paulatinamente en Europa a lo largo del siglo XIX al irse extendiendo el cultivo de la patata, introducida desde Sudamérica.

En 1747, James Lind, un médico escocés de la Marina Real, llevó a cabo el primer estudio clínico controlado de la historia. Durante un largo viaje en el buque de guerra de 50 cañones HMS *Salisbury*, Lind seleccionó doce marineros que sufrían de escorbuto y los separó en grupos de dos. Los doce recibieron la misma dieta, con la excepción de que cada grupo recibió un remedio distinto para el escorbuto de entre los que se hallaban entonces descritos. Aquellos que recibieron limones y naranjas se recuperaron y volvieron al trabajo. Los que recibieron zumo de manzana hervido mejoraron ligeramente, mientras que el resto continuó su deterioro. El *Tratado sobre el escorbuto* de Lind se publicó en 1753, pero la flota real siguió ignorando los hechos durante otros 40 años. En 1795 el Almirantazgo británico ordenó, finalmente, proporcionar una ración de zumo de lima o limón concentrado a todos los marineros británicos (y de ahí su sobrenombre "limeys"). El escorbuto continuó siendo un problema en otras partes del mundo hasta 1932, cuando el científico húngaro Albert Szent-Györgyi junto con W. A. Waugh y C.G. King de la Universidad de Pittsburg aislaron y sintetizaron el ácido ascórbico.



James Lind, 1716-1794; cirujano naval. 1739-1748 [Fuente: Library, Archive and Family History Enquiries, Royal College of Physicians of Edinburgh.]

El ácido L-ascórbico, vitamina C, es un polvo cristalino blanco e inodoro. Es muy soluble en agua y relativamente insoluble en disolventes orgánicos. En estado seco y protegido de la luz es estable durante prolongados períodos de tiempo. La cantidad diaria recomendada de vitamina C en los Estados Unidos es de 90 mg para los hombres y 75 mg para las mujeres. El Reino Unido recomienda 40 mg, Australia 45 mg y Rusia 50-100 mg. Además de los cítricos y casi todas las frutas frescas, los pimientos, tomates, patatas y bróquil son buenas fuentes de vitamina C. La vitamina C de frutas y vegetales se destruye con la excesiva cocción o un almacenamiento muy prolongado.

¿Cuál es la razón de que el ascorbato sea tan necesario para la salud? Aquí nos interesa específicamente su papel en la formación del colágeno. Como se ha comentado en el texto, el colágeno se construye a partir de un tripéptido repetido de Gly-X-Y, en donde X e Y son generalmente Pro o 4-Hyp –el derivado de la prolina (4*R*)-L-hidroxiprolina, que juega un papel esencial en el

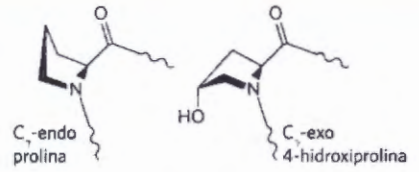


FIGURA 1 Las conformaciones C_γ-endo de la prolina y C_γ-exo de la 4-hidroxiprolina.

plegamiento del colágeno y en el mantenimiento de su estructura. El anillo de prolina se encuentra normalmente como una mezcla de dos conformaciones no planares denominadas C_γ-endo y C_γ-exo (Fig. 1). La estructura de la hélice del colágeno exige que los residuos Pro en las posiciones Y estén en la conformación C_γ-exo, y ésta es la conformación impuesta por la hidroxilación en C-4 de la 4-Hyp. La estructura del colágeno exige qne los residuos Pro en la posición X estén en la conformación C_γ-endo, y la introducción de 4-Hyp en esta posición podría desestabilizar la hélice. La incapacidad de hidroxilar Pro en posición Y en ausencia de vitamina C provoca la inestabilidad del colágeno y los problemas de tejido conjuntivo observados en el escorbuto.

La hidroxilación de residuos Pro específicos en el procolágeno, el precursor del colágeno, necesita de la participación del enzima prolil 4-hidroxilasa. Este enzima (M_r 240.000) se encuentra como un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ en todos los vertebrados. La actividad hidroxilante de prolinas reside en la subunidad α. Cada subunidad α contiene un átomo de hierro no hemo (Fe^{2+}), y el enzima pertenece a una clase de hidroxilasas que requieren α-cetoglutarato en sus reacciones.

En la reacción normal de la prolil 4-hidroxilasa (Fig. 2a), una molécula de α-cetoglutarato y una de O_2 se unen al enzima. El α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente formando CO_2 y succinato. El átomo de oxígeno restante se utiliza para hidroxilar un residuo Pro específico del procolágeno. En esta reacción no es necesario el ascorbato. Sin embargo, la prolil 4-hidroxilasa también cataliza una reacción de descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato que no está acoplada a la hidroxilación de prolina (Fig. 2b). Durante esta reacción, el Fe^{2+} se oxida, inactivando el enzima y haciéndolo incapaz de hidroxilar prolina. El ascorbato consumido en la reacción es necesario para reducir el átomo de hierro del grupo hemo, permitiendo la recuperación la actividad enzimática.

El escorbuto sigue siendo un problema hoy en día. La enfermedad se encuentra no sólo en lugares remotos con problemas de nutrición, sino, sorprendentemente, también en los campus universitarios americanos. Las únicas verduras consumidas por algunos estudiantes son los de alguna esporádica ensalada y pasan días sin que estos jóvenes adultos consuman fruta. Un estudio de 1998 entre 230 estudiantes de la Universidad del Estado de Arizona reveló que el 10% sufría una seria deficiencia de vitamina C, y 2 de ellos presentaban un nivel tan bajo que probablemente padecían escorbuto. Tan solo la mitad de los estudiantes del estudio consumían la cantidad diaria recomendada de vitamina C.

¡Tómense su verdura y su fruta frescas!

*De Ethel Wedgwood, *The Memoirs of the Lord of Joinville: a New English Version*, E.P. Dutton and Company, 1906.

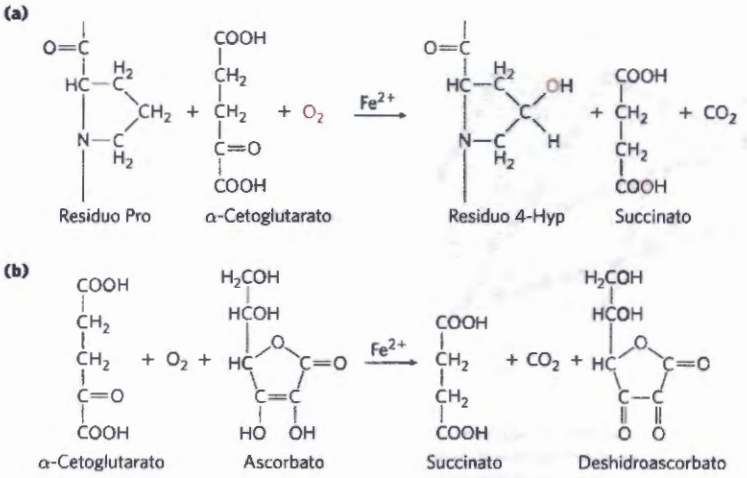
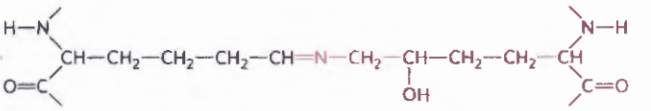


FIGURA 2 Reacciones catalizadas por la prolil 4-hidroxilasa. **(a)** La reacción normal, acoplada a la hidroxilación de prolina, y que no requiere ascorbato. En rojo se muestra el destino de los dos átomos de oxígeno del O_2. **(b)** La reacción desacoplada, en la que el α-cetoglutarato se descarboxila oxidativamente sin hidroxilación de la prolina. El ascorbato se consume estequiométricamente en esta reacción al convertirse en deshidroascorbato que evita la oxidación del Fe^{2+}.

Colágeno Al igual que las α-queratinas el colágeno ha evolucionado para proporcionar fuerza. Se encuentra en el tejido conjuntivo de, por ejemplo, tendones, cartílagos, matriz orgánica de los huesos y córnea del ojo. La hélice del colágeno es una estructura secundaria única, bastante distinta de la hélice α. Es levógira y tiene tres residuos aminoácidos por vuelta (**Fig. 4-12** y Tabla 4-1). El colágeno también es una estructura superenrollada, pero con estructuras terciaria y cuaternaria distintas: tres cadenas polipeptídicas separadas, denominadas cadenas α (no deben confundirse con hélices α), están superenrolladas una alrededor de la otra (Fig. 4-12c). En el colágeno el enrollamiento superhelicoidal es dextrógiro, en sentido opuesto a la hélice levógira de las cadenas α.

Existen muchos tipos de colágeno en vertebrados. Normalmente contienen aproximadamente un 35% de Gly, un 11% de Ala y un 21 % de Pro y de 4-Hyp (4-hidroxiprolina, un aminoácido no estándar; véase la Fig. 3-8a). El producto alimenticio gelatina deriva del colágeno; tiene poco valor alimenticio como proteína porque el colágeno carece de cantidades significativas de muchos aminoácidos esenciales en la dieta humana. El contenido de aminoácidos no habituales en el colágeno está relacionado con restricciones estructurales características de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos del colágeno consiste generalmente en la repetición de un tripéptido del tipo Gly-X-Y donde X es a menudo Pro e Y es a menudo 4-Hyp. Solo los residuos de Gly pueden acomodarse en las estrechas uniones entre las cadenas α individuales (Fig. 4-12d). Los residuos Pro y 4-Hyp permiten el marcado giro de la hélice del colágeno. La secuencia de aminoácidos y la estructura cuaternaria superhelicoidal del colágeno permiten un estrecho empaquetamiento de sus tres cadenas polipeptídicas. La 4-hidroxiprolina juega un papel especial en la estructura del colágeno y en la historia de la humanidad (Recuadro 4-3).

El estrecho empaquetamiento de las cadenas α en la triple hélice del colágeno proporciona más fuerza de tensión que un cable de acero de idéntica sección. Las fibrillas de colágeno (**Fig. 4-13**) son entramados supramoleculares constituidos por moléculas de colágeno en triple hélice (denominadas a veces moléculas de tropocolágeno) asociadas en una variedad de formas que proporcionan diferentes grados de fuerza tensil. Las cadenas α de las moléculas de colágeno y las moléculas de colágeno de las fibrillas están entrecruzadas por enlaces covalentes poco habituales en los que intervienen residuos de Lys, HyLys (5-hidroxilisina; véase la Fig. 3-8a) o His presentes en unas pocas posiciones X o Y. Estas uniones dan lugar a residuos aminoácidos no estándar tales como la deshidrohidroxilisinonorleucina. La rigidez y la fragilidad cada vez mayores del tejido conjuntivo ligadas al envejecimiento son el resultado de la acumulación de entrecruzamientos covalentes en las fibrillas de colágeno.



Deshidrohidroxilisononorleucina

Un mamífero típico posee más de 30 variedades estructurales de colágeno localizadas en diferentes tejidos cada una de las cuales difiere ligeramente en secuencia y función. Algunos defectos genéticos humanos en la estructura del colágeno ilustran la íntima relación existente entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional en esta proteína. La osteogénesis imperfecta se caracteriza por la formación anormal de los huesos en bebés; existen al menos ocho variantes de esta enfermedad en la población humana, con grados diversos de gravedad. El síndrome de Ehlers-Danlos, del que se conocen al menos seis variantes en la población humana, produce debilidad en las articulaciones. El compositor Niccolò Paganini (1782-1840) era famoso por su increíble destreza tocando el violín. Estaba afectado por una variante del síndrome de Ehlers-Danlos que le confería una hiperextensibilidad en las articulaciones. Ciertas variantes de ambas enfermedades pueden ser letales, mientras que otras acarrean problemas de por vida.

Todas las variantes de los síndromes comentados anteriormente son el resultado de la sustitución de una única Gly en una cadena α de una u otra proteína de colágeno por un residuo aminoácido con un grupo R más voluminoso (como Cys o Ser), sustituyéndose un

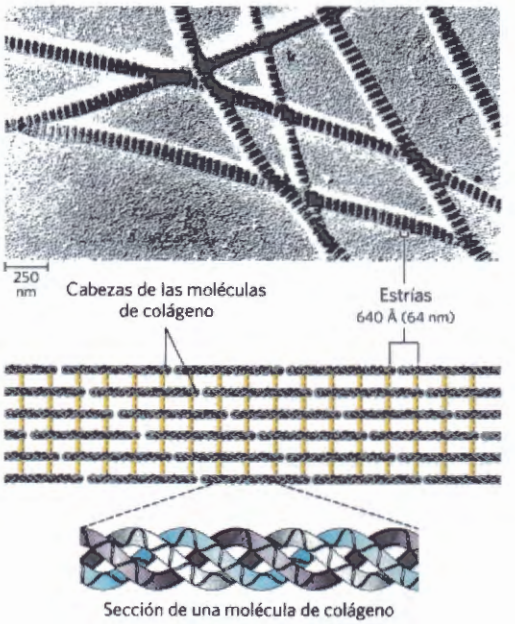


FIGURA 4-13 Estructura de las fibrillas del colágeno. El colágeno (M_r 300.000) es una molécula en forma de vara, de aproximadamente 3000 Å de longitud y solamente 15 Å de grosor. Sus tres cadenas α enrolladas pueden tener secuencias diferentes pero cada una de ellas tiene aproximadamente 1.000 residuos aminoácidos. Las fibrillas de colágeno se forman a partir de moléculas de colágeno alineadas de manera escalonada y entrecruzadas para tener fuerza. El alineamiento específico y el grado de entrecruzamiento varían con el tejido y origina las estrías características en las micrografías electrónicas. En el ejemplo aquí mostrado, el alineamiento de los grupos de cabeza de cada cuarta molécula produce estrías distantes 640 Å (64 nm) entre ellas. [Micrografía original de: J. Gross/ Biozentrum, University of Basel/Science Source.]

residuo Gly diferente en cada caso. Estas sustituciones de un solo residuo tienen un efecto catastrófico sobre la función del colágeno, pues destruyen la estructura repetitiva Gly-X-Y que confiere al colágeno su estructura helicoidal única. La glicina, debido a su papel en la triple hélice del colágeno (Fig.4-12d), no puede ser sustituida por ningún otro residuo aminoácido sin un efecto perjudicial en la estructura. ■

Fibroína de la seda La fibroína, la proteína de la seda, es producida por los insectos y las arañas. Sus cadenas polipeptídicas están mayoritariamente en conformación β. La fibroína es rica en residuos Ala y Gly, lo que permite un empaquetamiento compacto de las hojas β y una disposición indentada de los grupos R **(Fig. 4-14)**. El uso exhaustivo de la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno entre todas las uniones peptídicas de los polipéptidos de cada hoja β y la optimización de las interacciones de van der Waals entre las hojas estabilizan la estructura global. La seda no se estira ya que la conformación β ya está muy extendida (Fig. 4-6). Sin embargo, la estructura es flexible debido a que las hojas se mantienen unidas mediante numerosas interacciones débiles en lugar de enlaces covalentes tales como los puentes disulfuro de las α-queratinas.

En las proteínas globulares la diversidad estructural refleja la diversidad funcional

En las proteínas globulares los diferentes segmentos de la cadena polipeptídica (o de múltiples cadenas polipeptídicas) se pliegan unos sobre otros, generando unas formas mucho más compactas que las que hemos visto en las proteínas fibrosas **(Fig. 4-15)**. El plegamiento proporciona también la diversidad estructural necesaria para que las proteínas puedan llevar a término una amplia variedad de funciones biológicas. Entre las proteínas globulares se incluyen enzimas, proteínas de transporte, proteínas motoras, proteínas reguladoras, inmunoglobulinas y proteínas con muchas otras funciones.

Nuestra discusión acerca de la estructura de las proteínas globulares comienza con los principios extraídos de las primeras estructuras proteicas descritas. A ésta le seguirá una descripción detallada de las subestructuras proteicas y una categorización comparativa. Este tipo de discusión sólo es posible gracias a la gran cantidad de información disponible en Internet a través de bases de datos de acceso público, en particular el Protein Data Bank (Recuadro 4-4).

La mioglobina proporcionó las primeras claves acerca de la complejidad de las estructuras proteicas globulares

El primer avance decisivo en la comprensión de la estructura tridimensional de las proteínas globulares se produjo gracias a los estudios de difracción de rayos X con la mioglobina, llevados a cabo por John Kendrew y colaboradores en los años 1950. La mioglobina es una proteína fijadora de oxígeno relativamente pequeña (M_r 16.700), que se encuentra en las células musculares. Su función es almacenar y facilitar la difusión del oxígeno en el músculo en rápida contracción. La mioglobina está formada por una única cadena polipeptídica de 153 residuos aminoácidos de secuencia conocida y por un solo

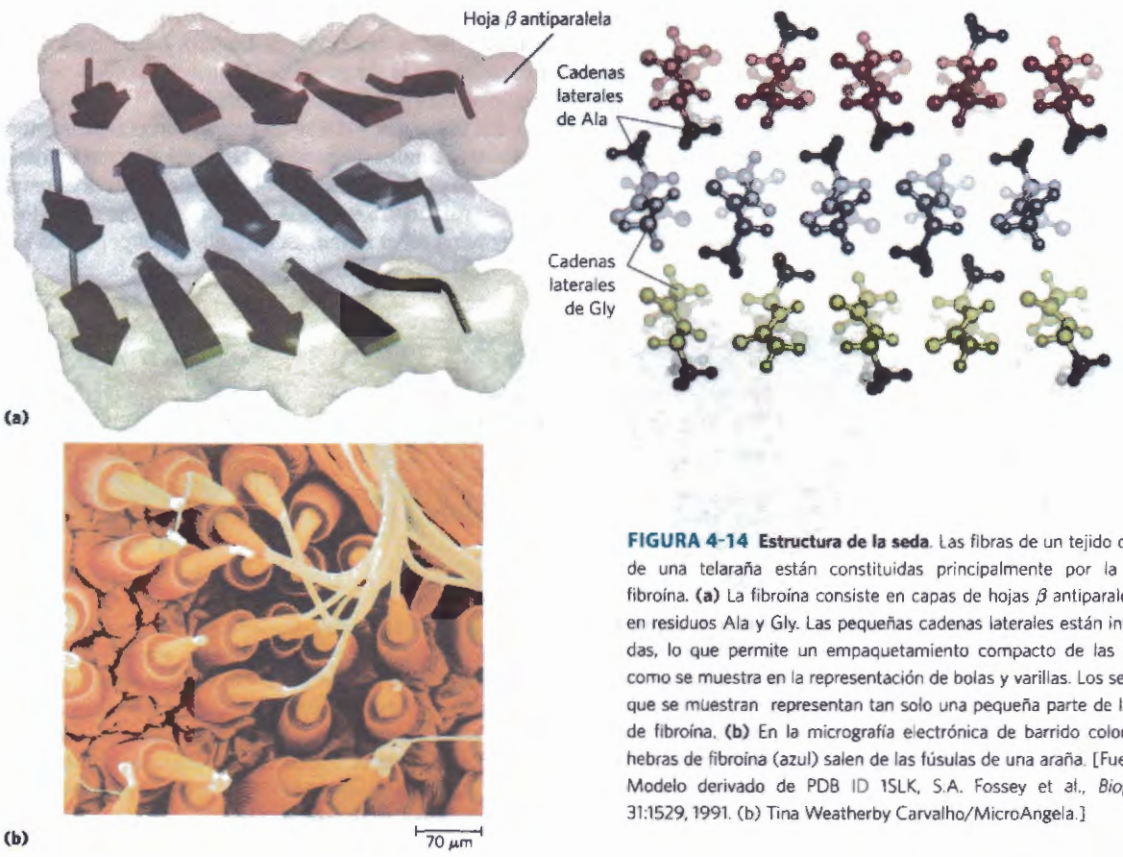


FIGURA 4-14 Estructura de la seda. Las fibras de un tejido de seda o de una telaraña están constituidas principalmente por la proteína fibroína. **(a)** La fibroína consiste en capas de hojas β antiparalelas ricas en residuos Ala y Gly. Las pequeñas cadenas laterales están interdigitadas, lo que permite un empaquetamiento compacto de las hojas tal como se muestra en la representación de bolas y varillas. Los segmentos que se muestran representan tan solo una pequeña parte de la cadena de fibroína. **(b)** En la micrografía electrónica de barrido coloreada las hebras de fibroína (azul) salen de las fúsulas de una araña. [Fuentes: (a) Modelo derivado de PDB ID 1SLK, S.A. Fossey et al., *Biopolymers* 31:1529, 1991. (b) Tina Weatherby Carvalho/MicroAngela.]

RECUADRO 4-4 El banco de datos de estructura de proteínas (Protein Data Bank, PDB)

El número de proteínas de las que se conoce actualmente la estructura tridimensional es actualmente superior a 100.000 y esta cantidad se multiplica por dos cada dos años. Esta enorme cantidad de información está revolucionando nuestro conocimiento sobre la estructura de proteínas, la relación estructura-función y los caminos evolutivos por los que las proteínas adquirieron su estructura actual, deducibles a partir de las relaciones dentro de familias estructurales que salen a la luz al analizar y seleccionar la información de las bases de datos. Uno de los recursos más importantes a disposición de los bioquímicos es el **Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas, PDB**; www.pdb.org).

El PDB es un archivo de estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas determinadas experimentalmente, que contiene prácticamente todas las estructuras macromoleculares (proteínas, RNA, DNA, etc.) deducidas hasta la fecha. A cada estructura se le asigna una etiqueta identificadora (un identificador de cuatro caracteres denominado PDB ID). Estas etiquetas se pueden ver en todos los pies de figura correspondientes a las ilustraciones de este libro en las que hay estructuras derivadas del PDB, con el fin de que profesores y estudiantes puedan explorarlas por su cuenta. Los archivos de datos del PDB describen las coordenadas espaciales de todos los átomos para los que se ha determinado su posición (muchas de las estructuras catalogadas no son completas). Otros archivos adicionales proporcionan información acerca de los métodos de determinación estructural y de la precisión, o resolución, de la estructura. Las coordenadas atómicas se pueden convertir en una imagen de la macromolécula utilizando los programas de visualización adecuados. Animamos a los estudiantes a acceder al PDB y explorar las estructuras utilizando el software de visualización que ofrece la propia base de datos. También es posible extraer una copia de los archivos de estructuras para luego explorarlas en el propio ordenador mediante software gratuito tal como Jmol.



FIGURA 4-15 Las estructuras de las proteínas globulares son compactas y variadas. La albúmina sérica humana (M_r 64.500) tiene 585 residuos en una sola cadena. En esta figura se muestran las dimensiones aproximadas de esta cadena polipeptídica sencilla, en el caso de que toda ella se hallara en la conformación extendida β o en hélice α. También se muestra el tamaño real de la proteína en su forma globular nativa, deducida a partir de cristalografía de rayos X; la cadena polipeptídica debe encontrarse plegada de forma compacta para poder adoptar estas dimensiones.

grupo ferroprotoporfirina o hemo. En la hemoglobina, la proteína fijadora de oxígeno de los eritrocitos, se encuentra un grupo hemo idéntico; él es el responsable del color rojo-amarronado oscuro de la mioglobina y de la hemoglobina. La mioglobina es muy abundante en los músculos de los mamíferos buceadores tales como la ballena, la foca y la marsopa, cuyos músculos son tan ricos en esta proteína que tienen un color marrón. El almacenamiento y distribución de oxígeno por la mioglobina muscular les permite permanecer sumergidos durante largos períodos de tiempo. La actividad de la mioglobina y la de otras moléculas de globina se investiga con más detalle en el Capítulo 5.

En la **Figura 4-16** se muestran varias representaciones estructurales de la mioglobina que ilustran la manera en que se pliega la cadena polipeptídica en tres dimensiones: su estructura terciaria. El grupo en rojo rodeado por la proteína es el hemo. El esqueleto polipeptídico de la

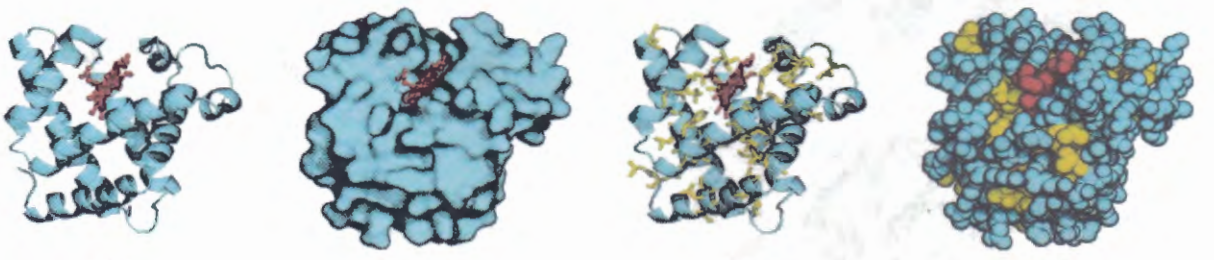


FIGURA 4-16 Estructura terciaria de la mioglobina de cachalote. (PDB ID 1MBO) La orientación de la proteína es la misma en todas las figuras; el grupo hemo se muestra en rojo. Además de ilustrar la estructura de la mioglobina, esta figura proporciona ejemplos sobre las diferentes maneras de representar la estructura de una proteína. **(a)** El esqueleto polipeptídico se muestra en una representación de cintas del tipo introducido por Jane Richardson, que destaca las regiones de estructura secundaria. Las regiones en hélice α se observan con claridad. **(b)** Imagen del contorno de la superficie de la proteína; resulta útil para visualizar las bolsas donde pueden unirse otras moléculas. **(c)** Representación de cintas que incluye las cadenas laterales (en amarillo) de los residuos hidrofóbicos Leu, Ile, Val y Phe. **(d)** Un modelo espacial con todas las cadenas laterales de los aminoácidos. Cada átomo está representado por una esfera que abarca su radio de van der Waals. La mayor parte de los residuos hidrofóbicos (también en amarillo) no son visibles, debido a que están sepultados en el interior de la proteína. [Fuente: PDB ID 1MBO, S.E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980.]

molécula de mioglobina está formado por ocho segmentos relativamente rectos de hélice α, conectados por giros, algunos de los cuales son giros β. La hélice α de mayor longitud tiene 23 residuos aminoácidos y la más corta solamente 7; todas ellas son dextrógiras. En las regiones α-helicoidales se encuentran más del 70% de los aminoácidos de la molécula de mioglobina. El análisis por rayos X reveló la posición precisa de cada uno de los grupos R, que ocupan prácticamente todo el espacio contenido dentro de los límites de la cadena plegada que no está ocupado por los átomos de la cadena principal.

A partir de la estructura de la mioglobina se extrajeron muchas conclusiones importantes. La posición de las cadenas laterales de los aminoácidos indica que la estructura debe gran parte de su estabilidad al efecto hidrofóbico. La mayor parte de los grupos R hidrofóbicos se hallan situados en el interior de la molécula de mioglobina, lejos del contacto con el agua. Todos los grupos R polares, excepto dos, se encuentran en la superficie externa de la molécula, y todos ellos están hidratados. La molécula de mioglobina es tan compacta que en su interior solamente hay espacio para cuatro moléculas de agua. Este denso núcleo hidrofóbico es típico de las proteínas globulares. La fracción de espacio ocupada por los átomos en un líquido orgánico oscila entre 0,4 y 0,6. En una proteína globular este valor está alrededor de 0,75, comparable al de un cristal (en un cristal típico la fracción está entre 0,70 y 0,78, cercana al máximo teórico). En este entorno tan empaquetado, las interacciones débiles se potencian mutuamente. Por ejemplo, las cadenas laterales apolares del núcleo se encuentran tan cercanas que las interacciones de van der Waals de corto alcance contribuyen significativamente a las interacciones hidrofóbicas estabilizantes.

La deducción de la estructura de la mioglobina confirmó algunas expectativas y a la vez introdujo algunos nuevos elementos de estructura secundaria. Como predijeron Pauling y Corey, todos los enlaces peptídicos se hallan en la configuración plana trans. Las hélices α de la mioglobina proporcionaron la primera prueba experimental directa de la existencia de este tipo de estructura secundaria. Tres de los cuatro residuos Pro de la mioglobina se encuentran en giros de la cadena. El cuarto residuo Pro se encuentra en una hélice α, donde origina la curvatura necesaria para un empaquetamiento compacto de la hélice.

El grupo hemo plano está situado en una hendidura o bolsa de la molécula de mioglobina. El átomo de hierro del centro del grupo hemo tiene dos posiciones de enlace (de coordinación) perpendiculares al plano del hemo **(Fig. 4-17)**. Una de estas posiciones se une al grupo R de un residuo His en la posición 93; la otra posición es el sitio donde se une una molécula de O_2. La accesibilidad del grupo hemo al disolvente está muy restringida en el interior de esta bolsa. Este hecho es muy importante para la función, puesto que los grupos hemo libres en una disolución oxigenada se oxidan rápidamente, pasando de la forma ferrosa (Fe^{2+}), activa en la unión reversible de O_2, a la forma férrica (Fe^{3+}), que no es capaz de fijar O_2.

Se ha determinado la estructura de muchas mioglobinas diferentes, lo que ha permitido observar los cambios estructurales producidos por la unión de oxígeno o de otras moléculas y comprender, por primera vez, la correlación entre estructura y función proteica. Desde entonces cientos de proteínas han sido sometidas a un análisis similar. Hoy en día, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y otras técnicas complementan los datos de difracción de rayos X, proporcionando más información sobre la estructura de una proteína (Recuadro 4-5). Además, la secuenciación del DNA genómico de muchos organismos (Capítulo 9) ha permitido identificar miles de genes que codifican proteínas de secuencia conocida pero función todavía desconocida; el trabajo en este campo continúa a ritmo acelerado.

TABLA 4-4 Proporciones aproximadas de hélice α y conformación β en algunas proteínas monocadena

	Residuos (%)[a]	
Proteína (residuos totales)	Hélice α	Conformación β
Quimotripsina (247)	14	45
Ribonucleasa (124)	26	35
Carboxipeptidasa (307)	38	17
Citocromo *c* (104)	39	0
Lisozima (129)	40	12
Mioglobina (153)	78	0

Fuente: Datos de C.R. Cantor y P.R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W.H. Freeman and Company, 1980.

[a]Las partes de las cadenas polipeptídicas no plegadas en hélice α o conformación β consisten en giros y fragmentos extendidos o plegados irregularmente. Los segmentos en hélice α o conformación β se desvían a veces ligeramente de sus dimensiones y geometría normales.

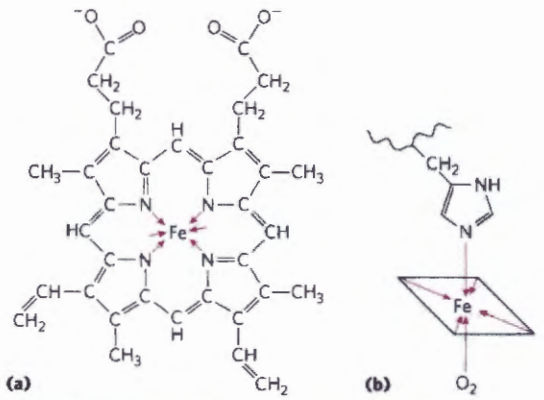
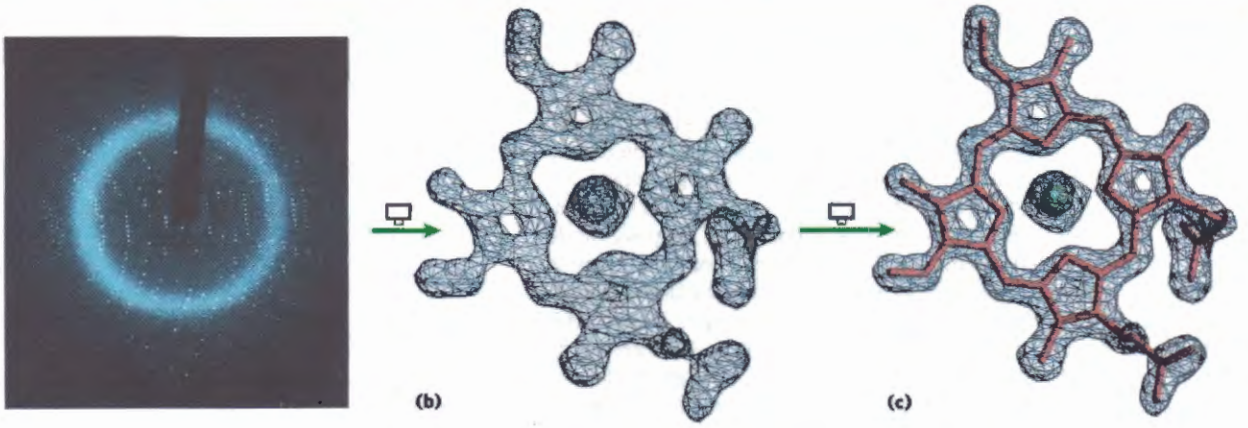


FIGURA 4-17 El grupo hemo. Este grupo está presente en la mioglobina, hemoglobina, citocromos y muchas otras hemoproteínas. **(a)** El hemo está formado por una estructura anular orgánica compleja, la protoporfirina, a la que se une un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}). El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro en el plano de la molécula plana de porfirina y unidos a ella, y dos perpendiculares a la misma. **(b)** En la mioglobina y en la hemoglobina, uno de los enlaces de coordinación perpendiculares está unido a un nitrógeno de un residuo His. El otro se encuentra "abierto" y sirve como sitio de unión para una molécula de O_2.

Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias diversas

Como consecuencia de la elucidación de las estructuras terciarias de cientos de proteínas globulares, es evidente que la mioglobina representa solamente una de las

RECUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína



Difracción de rayos X

El espaciado entre átomos de una red cristalina puede determinarse midiendo la localización y la intensidad de las manchas producidas en una película fotográfica por un haz de rayos X de longitud de onda conocida después de ser difractado por los electrones de los átomos. Por ejemplo, el análisis por rayos X de cristales de NaCl demuestra que los iones Na^+ y Cl^- están distribuidos en una red cúbica sencilla. Los métodos de difracción de rayos X también permiten estudiar el espaciado de diferentes tipos de átomos en moléculas orgánicas complejas, incluso tan grandes como las proteínas. Sin embargo, la técnica para analizar cristales de moléculas complejas es mucho más difícil que para los cristales sencillos de sal. Cuando el patrón repetitivo del cristal es una molécula tan grande como, por ejemplo, una proteína, el gran número de átomos de una molécula da lugar a millares de señales de difracción que deben analizarse por ordenador.

Consideremos el modo en que se generan las imágenes en un microscopio óptico. La luz emitida desde una fuente puntual se enfoca sobre un objeto. Las ondas luminosas son dispersadas por el objeto y recombinadas por unas lentes que generan una imagen aumentada del objeto. El tamaño menor de un objeto cuya estructura puede determinarse mediante este sistema (el poder resolutivo del microscopio) viene determinado por la longitud de onda de la luz, en este caso luz visible con longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm. Los objetos menores que la mitad de la longitud de onda de la luz incidente no pueden ser resueltos. Para resolver objetos tan pequeños como las proteínas, son necesarios los rayos X, cuyas longitudes de onda se encuentran en el intervalo de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). No existen, sin embargo, lentes que puedan recombinar los rayos X para formar una imagen; en su lugar el patrón de difracción de los rayos X se recoge directamente y a continuación se convierte en una imagen mediante técnicas matemáticas.

La cantidad de información obtenida mediante cristalografía de rayos X depende del grado de orden estructural de la muestra. A partir de los primeros estudios de los patrones de difracción de proteínas fibrosas que presentan una ordenación regular en cabellos y lana se obtuvieron algunos parámetros estructurales importantes. Sin embargo, los haces ordenadamente formados por proteínas fibrosas no son cristales, las moléculas se disponen una al lado de otra pero no todas están orientadas en la misma dirección. La obtención de información estructural tridimensional más detallada hace necesario partir de cristales de proteína altamente ordenados. No se conocen aún las estructuras de muchas proteínas importantes, simplemente por la dificultad en cristalizarlas. Los que trabajan en ello, han comparado la dificultad de obtener cristales de proteína con la de conseguir mantener pelotas del juego de bolos unidas con cinta adhesiva.

Operativamente, se pueden distinguir diferentes etapas en el análisis estructural por rayos X (Fig. 1). Se coloca un cristal, en un haz de rayos X, entre la fuente de rayos X y el detector y se genera un modelo regular de señales de difracción denominadas reflexiones. Las señales o puntos se generan por el haz de rayos X difractado, y cada uno de los átomos de la molécula contribuye en cada uno de los puntos. El patrón global de difracción de las señales permite reconstruir un mapa de densidad electrónica de la proteína mediante una herramienta matemática llamada transformada de Fourier. A efectos prácticos es como si el ordenador actuara como una "lente computacional". A continuación se construye un modelo para la estructura consistente con el mapa de densidad electrónica.

John Kendrew observó que el patrón de difracción de rayos X de la mioglobina cristalina (aislada de músculo de cachalote) es muy complejo, con unas 25.000 reflexiones. El estudio de éstas por ordenador se hizo en varias etapas. En cada una de ellas se mejoró la resolución, hasta que en 1959 pudieron determinarse las posiciones de casi todos los átomos (excluidos los de hidrógeno). La secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida por análisis químico coincidía con el modelo molecular. Desde entonces se han determinado las estructuras de miles de proteínas, muchas de ellas mucho más complejas que la mioglobina, con una resolución similar.

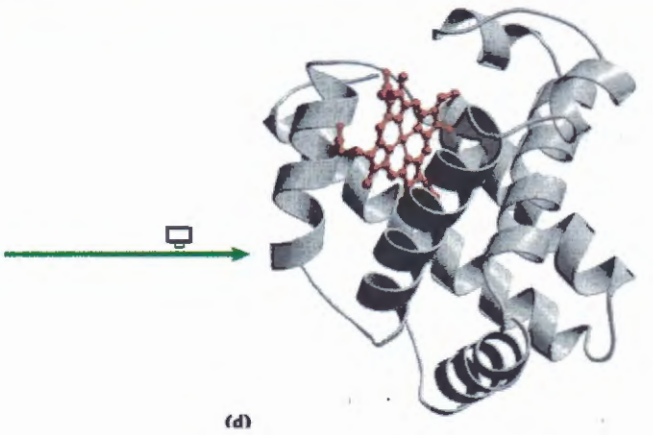


FIGURA 1 Etapas en la determinación de la estructura de la mioglobina de cachalote mediante cristalografía de rayos X. **(a)** Se generan patrones de difracción de rayos X a partir de un cristal de proteína. **(b)** Los datos extraídos de los patrones de difracción se utilizan para calcular un mapa de densidad electrónica tridimensional. Se muestra la densidad electrónica de sólo una parte de la estructura, el hemo. **(c)** Las regiones con mayor densidad electrónica indican la localización de núcleos atómicos, y esta información se utiliza para recomponer la estructura final. Aquí se modeló la estructura del grupo hemo dentro de su mapa de densidad electrónica. **(d)** La estructura completa de la mioglobina de cachalote, incluyendo el hemo. [Fuentes: (a, b, c) Cortesía de George N. Phillips, Jr. University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry. (d) PDB ID 2MBW, E.A. Brucker et al., *J. Biol. Chem.* 271:25, 419, 1996.]

El entorno físico en el interior del cristal no es idéntico, por supuesto, al de una solución o de una célula viva. Un cristal impone un espacio y un tiempo promedio en la estructura deducida de su análisis, y los estudios de difracción de rayos X aportan información escasa acerca de los movimientos moleculares en el interior de la proteína. La conformación de las proteínas en un cristal podría, en principio, verse también afectada por factores no fisiológicos tales como contactos accidentales proteína-proteína en el interior del cristal. Sin embargo, cuando se comparan las estructuras obtenidas de los análisis cristalográficos con la información estructural obtenida de otras formas (como la RMN, que se describe a continuación), las estructuras procedentes del cristal casi siempre representan una conformación funcional de la proteína. La cristalografía de rayos X puede aplicarse de forma satisfactoria a proteínas demasiado grandes para ser analizadas estructuralmente por RMN.

Resonancia magnética nuclear

Una de las ventajas de los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) es que se realizan con las macromoléculas en solución, mientras que la cristalografía de rayos X está limitada a moléculas que pueden ser cristalizadas. La RMN incluso puede penetrar en la parte dinámica de la estructura de las proteínas, lo que incluye los cambios conformacionales, el plegamiento de la proteína y las interacciones con otras moléculas.

La RMN es una manifestación del momento angular de spin nuclear, una propiedad mecánico-cuántica del núcleo atómico. Sólo ciertos átomos, entre los que se incluye 1H, 13C, 15N, 19F y 31P, poseen el tipo de spin nuclear que da lugar a la señal de RMN. El spin nuclear genera un dipolo magnético. Cuando a una disolución que contiene un solo tipo de macromolécula se le aplica un campo magnético intenso y estático, los dipolos magnéticos se alinean en el campo en una de dos orientaciones, paralela (energía baja) o antiparalela (energía alta). Se aplica un pulso breve (~10 *ms*) de energía electromagnética de una frecuencia adecuada (frecuencia de resonancia, dentro de la zona de radiofrecuencia) y en ángulo recto con los núcleos alineados en el campo magnético. Parte de la energía es absorbida debido al paso del núcleo al estado de energía elevada y el espectro de absorción resultante contiene información acerca de la identidad del núcleo y de su entorno químico inmediato. Para generar un espectro de RMN como el que muestra la Figura 2, se recogen los datos de muchos experimentos llevados a cabo sobre una muestra y se promedian, aumentando así la relación señal-ruido.

El ^{1}H es especialmente importante en los experimentos de RMN debido a su elevada sensibilidad y abundancia natural. El espectro de RMN ^{1}H puede llegar a ser muy complicado en el caso de las macromoléculas. Incluso una proteína pequeña tiene cientos de átomos ^{1}H, dando lugar a un espectro de RMN monodimensional demasiado complejo para analizar. El análisis estructural de proteínas fue posible con la llegada de las técnicas de RMN bidimensional (Fig. 3). Estos métodos permiten medir los acoplamientos dependientes de la distancia y a través del espacio de los spines nucleares en átomos cercanos (el efecto nuclear Overhauser (NOE), aplicado a un método

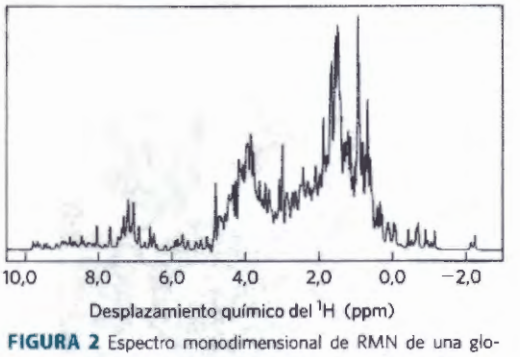


FIGURA 2 Espectro monodimensional de RMN de una globina de un gusano marino. Esta proteína y la mioglobina de cachalote son análogos estructurales muy cercanos, pertenecientes a la misma familia estructural de proteínas y comparten la función de transporte de oxígeno. [Fuente: Datos de B.F. Volkman, National Magnetic Resonance Facility at Madison.]

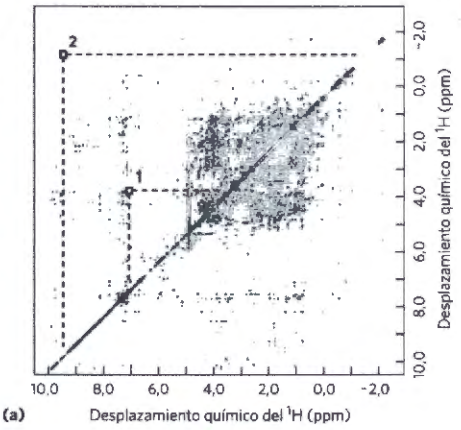
RECUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína *(Continuación)*

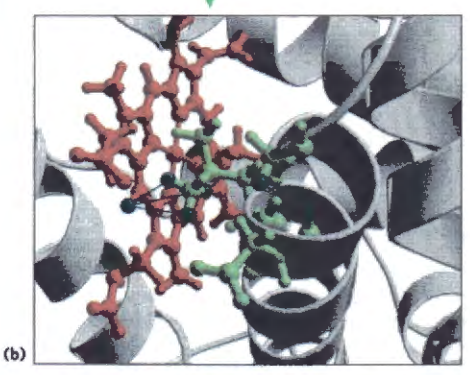
denominado NOESY) o el acoplamiento de spines nucleares de átomos conectados por enlaces covalentes (espectroscopia de correlación total, o TOCSY).

La traducción de un espectro bidimensional de RMN en una estructura tridimensional completa puede ser un proceso laborioso. Las señales de NOE aportan cierta información sobre las distancias entre átomos individuales, pero para que estas restricciones en las distancias puedan ser útiles, se han de identificar los átomos que originan estas señales. Los experimentos complementarios de TOCSY pueden ayudar a identificar qué señales NOE corresponden a átomos que están unidos por enlaces covalentes. Ciertos patrones de señales NOE se han asociado con estructuras secundarias tales como la hélice α. La ingeniería genética (Capítulo 9) puede utilizarse para producir proteínas que contengan los isótopos raros 13C o 15N. Las nuevas señales de RMN producidas por estos átomos y el acoplamiento con las señales de ^{1}H producidas por estas sustituciones, son de ayuda en la asignación de las señales individuales de ^{1}H NOE. Este proceso también está favorecido por el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Para generar una estructura tridimensional, se introducen las restricciones de distancia en un ordenador junto con restricciones geométricas conocidas como por ejemplo la quiralidad, los radios de van der Waals y las longitudes de enlace y los ángulos. El ordenador genera una familia de estructuras estrechamente relacionadas que representan una gama de conformaciones consistente con las restricciones de distancia de los NOE (Fig. 3c). La dispersión en las estructuras generadas por RMN es en parte un reflejo de las vibraciones moleculares (la "respiración") de la estructura de la proteína en disolución, que se discutirá con más detalle en el Capítulo 5. También juega su papel la variación experimental normal en los datos obtenidos.

Las estructura proteicas determinadas tanto por cristalografía de rayos X como por RMN, presentan por lo general una buena correlación. En algunos casos, las localizaciones precisas de determinadas cadenas laterales de aminoácidos en el exterior de la proteína son diferentes, a menudo a causa de efectos relacionados con el empaquetamiento de moléculas de proteína adyacentes en el cristal. Las dos técnicas juntas son las responsables de un rápido incremento en la disponibilidad de información estructural sobre las macromoléculas de las células vivas.





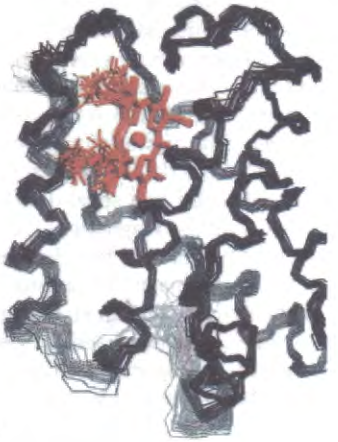


FIGURA 3 Uso de la RMN bidimensional para generar una estructura tridimensional de una globina, la misma proteína que se utilizó para generar los datos de la Figura 2. En el espectro bidimensional de RMN la diagonal es equivalente a un espectro monodimensional. Los picos fuera de la diagonal son señales NOE generadas por interacciones de corto alcance de átomos ^{1}H, que pueden generar señales muy distantes en un espectro monodimensional. En **(a)** se identifican dos de estas interacciones y sus identidades se muestran en **(b)**. Las tres líneas dibujadas describen la interacción 2 entre un grupo metilo en la proteína y un hidrógeno en el hemo. El grupo metilo gira rápidamente de forma que cada uno de sus tres hidrógenos contribuye de forma equivalente a la interacción y a la señal de RMN. Este tipo de información se utiliza para determinar la estructura tridimensional completa, como se muestra en **(c)**. Las múltiples líneas con que se presenta el esqueleto de la proteína en (c) representan una familia de estructuras consistentes con las restricciones de distancia en los datos de RMN. Es evidente la similitud estructural con la mioglobina (Fig. 1). En ambas figuras las proteínas están orientadas en la misma dirección. [Fuentes: Datos y soporte en el diseño de la figura, cortesía de B.F. Volkman, National Magnetic Resonance Facility at Madison. (b) PDB ID 1VRF y (c) PDB ID 1VRE, B.F. Volkman et al., *Biochemistry* 37:10, 906, 1998.]

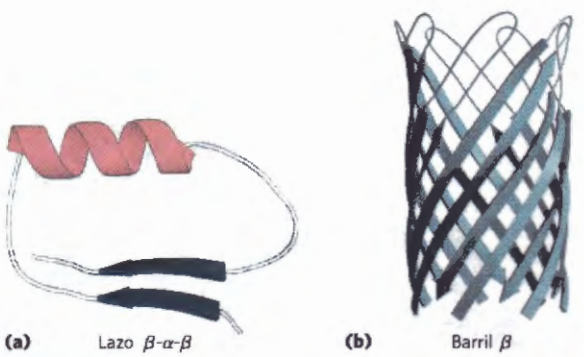


FIGURA 4-18 Motivos. (a) Un motivo simple, el lazo β-α-β **(b)** Un motivo más elaborado, el barril β. Este barril β es un único dominio de la α-hemolisina (una toxina que mata las células creando un agujero en su membrana) de la bacteria *Staphylococcus aureus*. [Fuentes: (a) Derivado de PDB ID 4TIM, E. Noble et al., *J. Med. Chem.*, 34:2709, 1991. (b) Derivado de PDB ID 7AHL, L. Song et al., *Science* 274:1859, 1996.]

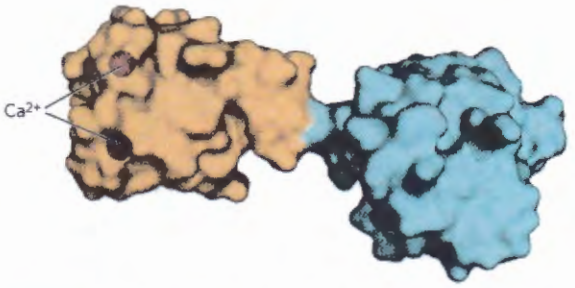


FIGURA 4-19 Dominios estructurales en el polipéptido troponina C. (PDB ID 4TNC) Esta proteína de fijación de calcio asociada con el músculo presenta dos dominios de fijación de calcio separados, indicados en azul y púrpura. [Fuente: PDB ID 4TNC, K.A. Satyshur et al., *J. Biol. Chem.* 263:1628, 1988.]

muchas posibilidades de plegamiento de una cadena polipeptídica. En la Tabla 4-4 se muestra las proporciones de las conformaciones α y β (en porcentaje de residuos de cada tipo) de varias proteínas globulares, pequeñas y de cadena única. Cada una de estas proteínas tiene una estructura específica y adaptada a su función biológica particular, pero todas ellas comparten propiedades importantes con la mioglobina. Todas tienen un plegamiento compacto y en todas ellas las cadenas laterales hidrofóbicas están orientadas hacia el interior (evitando el contacto con el agua) y las cadenas laterales hidrofílicas se hallan en la superficie. Las estructuras están también estabilizadas por multitud de enlaces de hidrógeno y por algunas interacciones iónicas.

Para el principiante, la gran complejidad de las estructuras terciarias de las proteínas globulares (algunas mucho más grandes que la mioglobina) se aprecia y se describe mejor en base a los patrones estructurales comunes que aparecen una y otra vez en proteínas diferentes y a menudo no relacionadas. La estructura tridimensional de una proteína globular típica se puede considerar como un conjunto de segmentos polipeptídicos en conformaciones de hélice α y hoja β unidas por segmentos de conexión. En una primera aproximación la estructura se puede describir mediante la forma en que se apilan estos segmentos y por la disposición de los segmentos que los conectan.

Para comprender una estructura tridimensional completa necesitamos analizar sus patrones de plegamiento. Empezaremos por definir dos términos importantes que describen los patrones o elementos estructurales de una cadena polipeptídica para continuar con las reglas de plegamiento.

El primero de estos términos es **motivo**, también llamado **plegamiento** o (más raramente) **estructura supersecundaria**. *Un motivo o plegamiento es un patrón de plegamiento reconocible que incluye dos o más elementos de estructura secundaria y las conexiones entre ellos.* Un motivo puede ser muy simple, como en el caso de dos elementos de estructura secundaria plegados uno sobre el otro, y representar tan solo una pequeña parte de la proteína. Un ejemplo de ello es el **lazo β-α- β (Fig. 4-18a)**. También puede tratarse de una estructura muy elaborada que incluya un buen número de segmentos de la proteína que se pliegan conjuntamente, como en el barril β (Fig. 4-18b). En algunos casos, un único motivo grande puede incluir toda la proteína. Los términos "motivo" y "plegamiento" se intercambian a menudo, pero "plegamiento" se aplica normalmente a patrones más complejos. Ambos términos abarcan cualquier patrón de plegamiento favorable y resultan útiles para describir dichos patrones. El segmento definido como motivo o plegamiento puede ser estable de forma independiente o no. Ya hemos visto un motivo bien estudiado, la superhélice (coiled coil) de la α-queratina, que también se encuentra en otras proteínas. La disposición específica de ocho hélices α en la mioglobina se repite en todas las globinas y recibe el nombre de plegamiento de globina. Observe que un motivo no es un elemento estructural jerárquico ubicado entre las estructuras secundaria y terciaria. Es simplemente un patrón de plegamiento. Por esta razón, el término sinónimo "estructura supersecundaria" genera confusión a veces al sugerir el concepto de jerarquía.

El segundo término utilizado para describir patrones estructurales es **dominio**. Un dominio es, según la definición de Jane Richardson en 1981, una parte de una cadena polipeptídica que es estable de manera independiente o que puede moverse como una entidad única con respecto al resto de la proteína. Los polipéptidos con más de unos pocos centenares de residuos aminoácidos suelen plegarse formando dos o más dominios, a veces con funciones diferentes. En muchos casos un dominio de una proteína grande mantendrá su estructura tridimensional correcta incluso cuando se separa (por rotura proteolítica, por ejemplo) del resto de la cadena polipeptídica. En una proteína con múltiples dominios, cada uno de ellos puede aparecer como un lóbulo globular distinto **(Fig. 4-19)**; sin embargo, es más habitual que los numerosos contactos entre dominios hagan difícil discernir los dominios individuales. A menudo los diferentes dominios tienen funciones distintas, tales como la unión de pequeñas moléculas o la interacción con otras proteínas. Normalmente las proteínas pequeñas tienen un solo dominio (el dominio *es* la proteína).

El plegamiento de los polipéptidos está sujeto a una serie de restricciones físicas y químicas y del estudio de los patrones más comunes de plegamiento se han podido deducir algunas reglas.

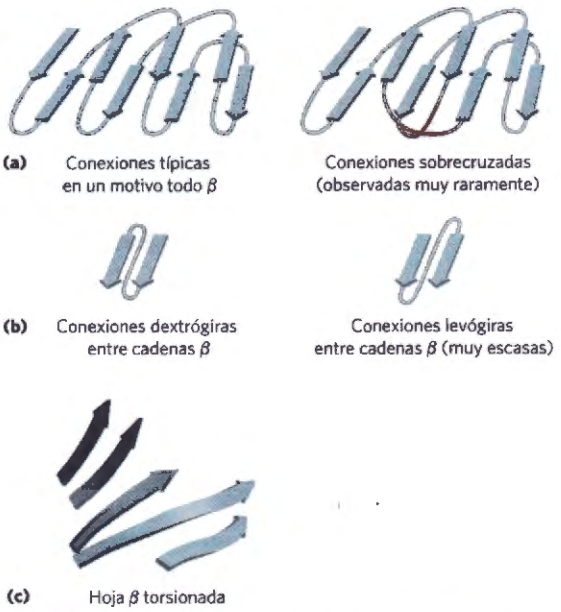


FIGURA 4-20 Patrones de plegamiento estables en proteínas. **(a)** Conexiones entre cadenas β en hojas β superpuestas. Se muestran las hojas desde un extremo, sin torsiones. Los conectores de un extremo determinado (por ejemplo, cerca del observador) raramente se cruzan entre sí. La cadena amarilla de la estructura de la derecha es un raro ejemplo de entrecruzamiento. **(b)** Debido a la torsión dextrógira de las cadenas β, las conexiones entre cadenas son generalmente dextrógiras. Las conexiones levógiras deben formar ángulos más agudos y son más difíciles de formar. **(c)** Esta hoja β torsionada forma parte de un dominio de la fotoliasa (una proteína que repara ciertos tipos de lesiones en el DNA) de *E.coli* (PDB ID 1DNP). Se han eliminado los lazos de conexión para concentrar la atención en el plegamiento de la hoja β. [Fuente: (a) Derivado de PDB ID 1DNP, H.W. Park et al., *Science*, 268:1866, 1995.]

1. El efecto hidrofóbico aporta una gran contribución a la estabilidad de las estructuras de las proteínas. La interiorización de los grupos R de los aminoácidos hidrofóbicos que permite la exclusión de las moléculas de agua requiere un mínimo de dos capas de estructura secundaria. Motivos sencillos, como el lazo β-α-β (Fig. 4-18a) crean estas dos capas.
2. Cuando coinciden simultáneamente en las proteínas, las hélices α y las hojas β se suelen localizan en diferentes capas estructurales. Esto es debido a que el esqueleto de un segmento polipeptídico en conformación β no puede formar fácilmente enlaces de hidrógeno con una hélice α adyacente (Fig. 4-6).
3. Los segmentos polipeptídicos adyacentes en la secuencia primaria están normalmente apilados uno junto al otro en la estructura plegada. Aunque segmentos distantes en el polipéptido pueden estar juntos en la estructura terciaria, ésta no es la norma habitual.
4. La conformación β tiene máxima estabilidad cuando los segmentos individuales están ligeramente torsionados en sentido dextrógiro. Esto influye tanto en la disposición relativa de las hojas β como en el camino retorcido que siguen las conexiones entre ellas. Por ejemplo, dos hebras β paralelas deben conectarse mediante una hebra que cruce por encima **(Fig. 4-20a)**. En principio, este cruzamiento por encima puede tener una conformación levógira o dextrógira, pero en las proteínas casi siempre es dextrógira. Las conexiones dextrógiras tienden a ser más cortas que las conexiones levógiras y tienden a emplear ángulos de giro menores, más fáciles de formar. La torsión de las hojas β también conduce a una torsión característica de la estructura formada cuando están juntos muchos segmentos, como en el caso del barril β (Fig. 4-18b) y la hoja β torsionada (Fig. 4-20c), que constituyen el núcleo de muchas estructuras mayores.

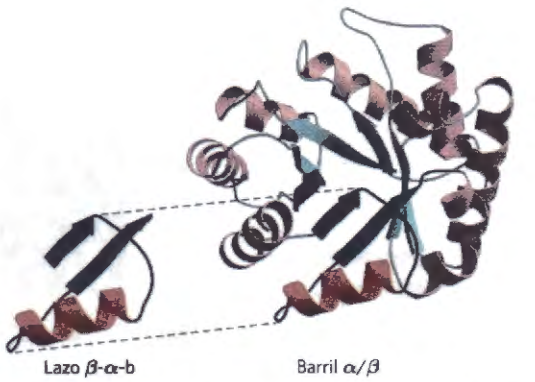


FIGURA 4-21 Construcción de dominios grandes a partir de otros más pequeños. El barril α/β es un motivo muy común construido a partir de repeticiones del motivo de lazo β-α-β. Este barril α/β es un dominio de la piruvato quinasa (un enzima glucolítico) de conejo. [Fuente: (a) Derivado de PDB ID 1PKN, T.M. Larsen et al., *Biochemistry*, 33:16301, 1994.]

Siguiendo estas reglas es posible construir motivos complejos a partir de otros más sencillos. Por ejemplo, una serie de lazos β-α-β, dispuestos de forma que las hebras β formen un barril, originan un motivo común muy estable denominado **barril α/β (Fig. 4-21)**. En esta estructura cada segmento β paralelo está unido a su vecino por un segmento de hélice α. Todas las conexiones son dextrógiras. El barril α/β se encuentra en muchos enzimas, a menudo con un sitio de unión (para un cofactor o sustrato) en forma de bolsa cerca de uno de los extremos del barril. Observe que de los dominios que presentan patrones de plegamiento similares se dice que tienen el mismo motivo incluso si sus hélices α y hojas β difieren en longitud.

Algunas proteínas o segmentos de proteína están intrínsecamente desordenados

A pesar de décadas de progreso en la comprensión de la estructura proteica muchas proteínas se resisten a cristalizar, lo que dificulta la determinación de su estructura tridimensional mediante los considerados métodos clásicos (véase el Recuadro 4-5). Incluso en los casos en que la cristalización tiene éxito, a menudo algunas partes de la proteína están lo suficientemente desordenadas en el cristal como para que la estructura obtenida no las incluya. A veces, esto es debido a características sutiles de la estructura que dificultan la cristalización. Sin embargo, la razón puede ser más simple: algunas proteínas o fragmentos de proteína carecen de estructura ordenada en disolución.

El concepto de que algunas proteínas funcionan en ausencia de una estructura definida procede de la revisión de los datos obtenidos de muchas proteínas diferentes. Hasta una tercera parte de las proteínas humanas pueden estar desestructuradas o contener fragmentos desestructurados considerablemente largos. Todos los organismos tienen algunas proteínas de esta clase. Las **proteínas intrínsecamente desordenadas** tienen propiedades distintas a las de las proteínas estructuradas clásicas. Carecen de núcleo hidrofóbico y presentan en cambio una elevada densidad de residuos cargados como Lys, Arg y Glu. También contienen muchos residuos Pro, que tienden a alterar las estructuras ordenadas.

El desorden estructural y la alta densidad de carga pueden facilitar una función espaciadora o aislante de algunas proteínas y también una acción enlazante en estructuras mayores. Otras proteínas desordenadas pueden actuar como recolectoras, uniendo iones y moléculas pequeñas en disolución y sirviendo como reservorios o depósitos de material de desecho. Sin embrago, muchas proteínas intrínsecamente desordenadas juegan un papel central en importantes redes de interacción de proteínas. La ausencia de estructura ordenada puede facilitar una cierta promiscuidad funcional, permitiendo que una proteína interaccione con muchas más. Algunas proteínas intrínsecamente desordenadas actúan inhibiendo la acción de otras proteínas mediante un mecanismo poco usual, envolviendo sus dianas proteicas. Una única proteína desordenada puede tener varias parejas, hasta docenas de ellas. El desorden estructural permite que la proteína inhibidora envuelva sus múltiples dianas de diversas maneras. La proteína intrínsecamente desordenada p27 tiene un papel central en el control de la división celular en mamíferos. Esta proteína carece de estructura definida en disolución. Se enrolla alrededor de varios enzimas denominados proteína quinasas que facilitan la división celular (véase el Capítulo 6), inhibiéndolos. La estructura flexible de p27 le permite acomodarse a sus diversas proteínas diana. Las células tumorales humanas, que simplemente han perdido la capacidad de controlar la división celular de manera normal, suelen presentar niveles reducidos de p27; cuanto más bajos los niveles de p27, peor es el pronóstico para el paciente de cáncer. De manera similar, proteínas intrínsecamente desordenadas suelen estar presentes como puntos de conexión o como elementos de sostén en el centro de redes proteicas que constituyen rutas de señalización (véase la Fig. 12-26). Estas proteínas, o partes de ellas, pueden interaccionar con muchos ligandos diferentes. Suelen adoptar una estructura al interaccionar con otras proteínas, pero esta estructura puede variar dependiendo de la pareja ligada. La proteína de mamíferos p53 tiene también un papel crucial en la división celular. Presenta tanto segmentos estructurados como desestructurados, que interaccionan con docenas de proteínas diferentes.

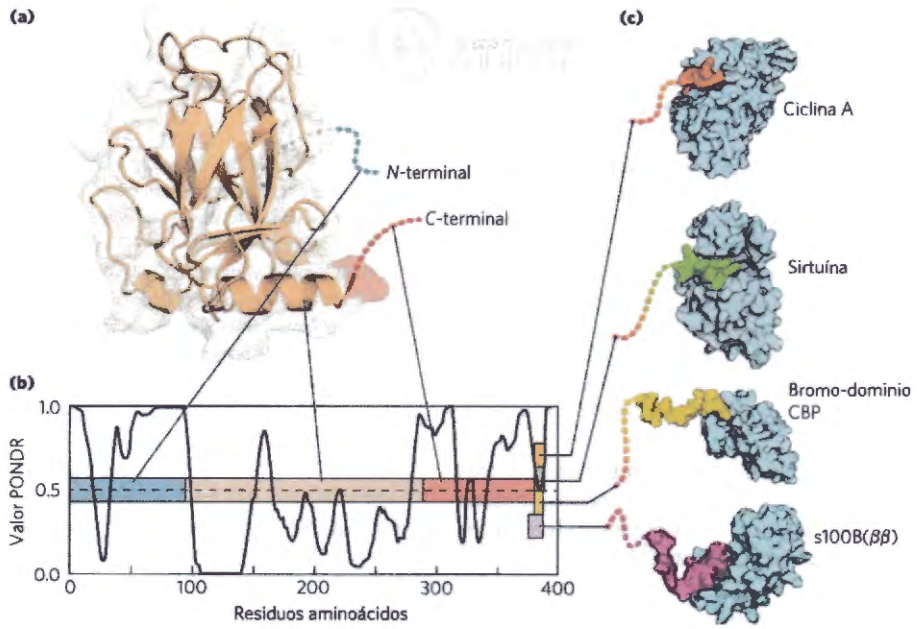


FIGURA 4-22 Unión del extremo carboxilo-terminal intrínsecamente desestructurado de la proteína p53 a sus ligandos. (a) La proteína p53 se compone de varios segmentos (PDB ID 1XQH). El dominio central es el único que está estructurado. **(b)** Se muestra la secuencia lineal de la proteína p53 en forma de barra coloreada. El gráfico superpuesto representa el valor de la predicción de PONDR (Predictor of Natural Disordered Regions - Predictor de regiones intrínsecamente desordenadas). El algoritmo PONDR es uno de los mejores en la predicción de la probabilidad de que un aminoácido determinado se encuentre en una región de desorden intrínseco, en base a la secuencia circundante y a la composición de aminoácidos. Una puntuación de 1,0 indica que la probabilidad de que una proteína esté desordenada es del 100%. En la estructura real de la proteína, el dominio central está ordenado. Las regiones amino-terminal (azul) y carboxilo-terminal (rojo) están desordenadas. El extremo de la región carboxilo-terminal tiene múltiples ligandos y se pliega cuando se une a cada uno de ellos; sin embargo, la estructura tridimensional adoptada cuando se produce la unión es diferente en cada caso y por esta razón el color del segmento carboxilo terminal (de 11 a 20 residuos) es diferente en cada complejo. [Fuentes: Información de V.N. Uversky, *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 43:1090, 2011, Fig. 5. (a) Derivado de PDB ID 1TUP, Y. Chuo et al.,*Science* 265:346, 1994. (c) Ciclina A: PDB ID 1H26, E.D. Lowe et al., *Biochemistry* 41:15,625, 2002; sirtuína: PDB ID 1MA3, J.L. Avalos et al., *Mol. Cell* 10:523, 2002; bromo-dominio CPB: PDB ID 1JSP, S. Mujtaba et al., *Mol. Cell* 13:251, 2004; s100(*ββ*): PDB ID 1D1T, R.R. Rustandi et al., *Nature Struct. Biol.* 7:570, 2000.]

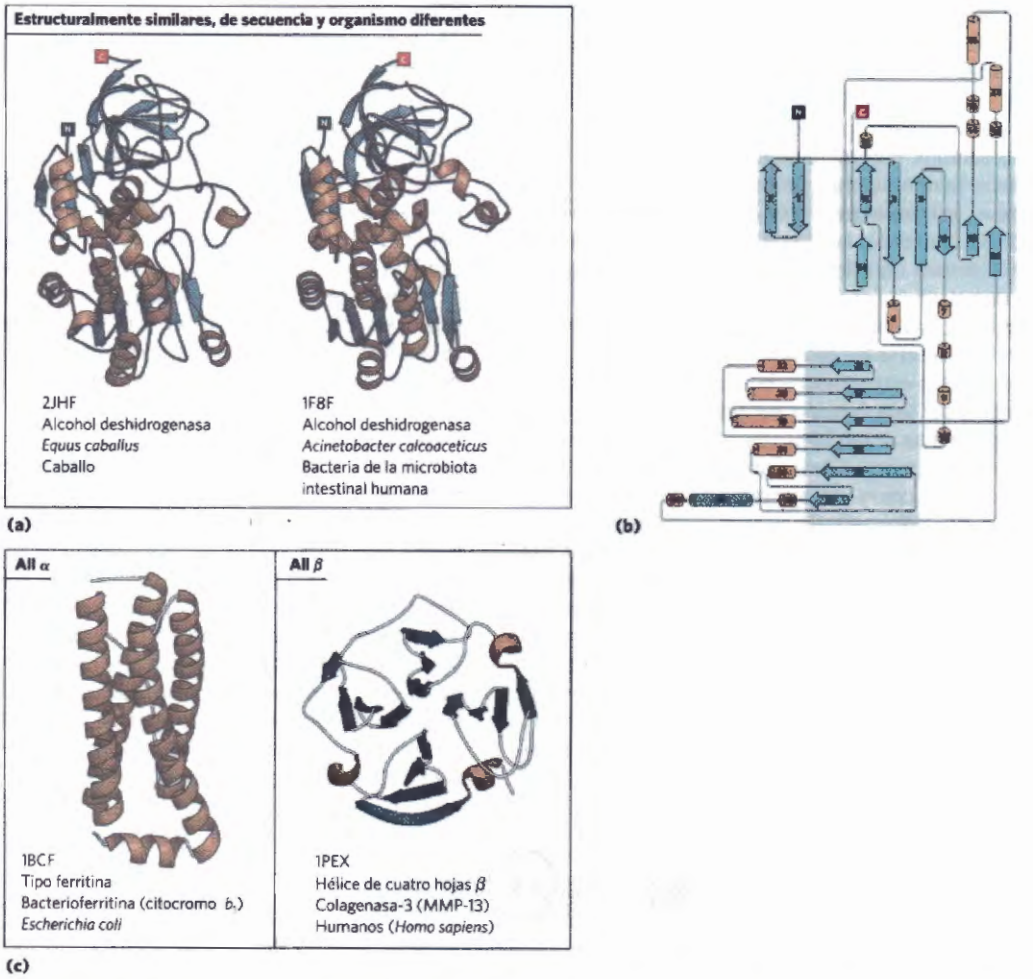


FIGURA 4-23 Organización de las proteínas basada en motivos. Aquí se muestra una pequeña parte de los cientos de motivos estables conocidos. **(a)** Diagramas estructurales del enzima alcohol deshidrogenasa de dos organismos diferentes. Comparaciones como ésta ilustran las relaciones evolutivas que conservan tanto la estructura como la función. **(b)** Diagrama topológico de alcohol deshidrogenasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Los diagramas topológicos proporcionan un modo de visualizar los elementos de estructura secundaria y sus interconexiones en dos dimensiones, y pueden ser de mucha utilidad en la comparación de motivos o plegamientos estructurales. **(c)** La base de datos Structural Classification of Proteins (SCOP2) (http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk) organiza los plegamientos de proteínas en cuatro clases: todo α, todo β, α/β y $\alpha+\beta$. Se muestran ejemplos de los plegamientos todo α y todo β junto con sus datos de clasificación estructural (PDB ID, nombre del plegamiento, nombre de la proteína y organismo de origen) de la base de datos SCOP2. El PDB ID es un código de acceso único que se da a cada estructura archivada en el Protein Data Bank (www.pdb.org). [Fuentes: (a) PDB ID 2JHF, R. Meijers et al., *Biochemistry* 46:5446, 2007; PDB ID 1F8F, J.C. Beauchamp et al. (c) PDB ID 1BCF,F. Frolow et al., *Nature Struct. Biol.* 1:453, 1994; PDB ID 1PEX, F.X. Gomis-Ruth et al., *J. Mol. Biol.* 264:556, 1996.]

Una región desestructurada de p53 en el extremo carboxilo-terminal interacciona con, al menos, cuatro ligandos diferentes y adopta una estructura diferente en cada uno de los complejos **(Fig. 4-22)**.

Los motivos proteicos constituyen la base de la clasificación estructural de las proteínas

El archivo del Protein Data Bank (PDB) alberga en la actualidad más de 100.000 estructuras de proteínas. Los datos allí contenidos suponen una enorme cantidad de información acerca de los principios estructurales, la función y la evolución de las proteínas. Por fortuna, otras bases de datos organizan esta información para hacerla más accesible. En la base de datos Structural Classification of Proteins, o SCOP2 (http://scop2.mrc-lmb.ca.ac.uk), es posible rastrear toda la información sobre proteínas contenida en el PDB en el marco de cuatro categorías diferentes: (1) relaciones entre proteínas, (2) clases estructurales, (3) tipos de proteínas, y (4) datos evolutivos. La primera categoría ofrece varias opciones: es posible buscar proteínas en base a características estructurales, relaciones evolutivas, u "otras" (en este último caso se trata de un intento de definir motivos y subplegamientos comunes). La segunda opción organiza todas las estructuras del PDB en base a sus elementos de estructura secundaria: **todo α, todo β, α/β** (con los segmentos α y β alternados o entremezclados), y **α + β** (con las regiones α y β segregadas total o parcialmente). La tercera categoría organiza las estructuras de proteínas en tipologías definidas, como solubles (globulares), de membrana, fibrosas e intrínsecamente desestructuradas. La última categoría rastrea reordenamientos estructurales y características poco habituales de proteínas relacionadas evolutivamente. La **Figura 4-23** muestra ejemplos de motivos proteicos extraídos de SCOP2 para ilustrar el poten-

cial de búsqueda dentro de cada categoría. La figura introduce también otra manera de representar los elementos de estructura secundaria y las relaciones de estos elementos en una proteína – el **diagrama topológico**.

El número de tipos de plegamiento no es infinito. Entre las más de 80.000 estructuras de proteínas distintas archivadas en el PDB tan sólo se hallan representados unos 1.200 plegamientos o motivos diferentes. El importante progreso consolidado a lo largo de muchos años en biología estructural hace que el descubrimiento de nuevos tipos de plegamiento sea cada vez menos frecuente. Existen muchos ejemplos de dominios o de motivos estructurales repetidamente observados que revelan que la estructura terciaria de proteínas se conserva mucho más que la secuencia primaria. La comparación de estructuras de proteínas puede proporcionar, por tanto, mucha información acerca de la evolución. Se dice que pertenecen a la misma **familia de proteínas**, aquellas que presentan una similitud significativa en su estructura primaria, que poseen una estructura terciaria y función similares, o que reúnen las dos características. Las estructuras de proteínas del PDB pertenecen a unas 4.000 familias diferentes. Dentro de una misma familia de proteínas suele resultar evidente la existencia de una relación evolutiva fuerte. Por ejemplo la familia de las globinas está formada por muchas proteínas diferentes con similitudes tanto estructurales como secuenciales con la mioglobina (como se puede ver en las proteínas utilizadas como ejemplo en el Recuadro 4-5 y en el Capítulo 5). Dos o más familias con escasa similitud en la secuencia de aminoácidos utilizan algunas veces el mismo motivo estructural principal y tienen funciones similares; estas familias se agrupan como **superfamilias**. La relación evolutiva entre las familias de una superfamilia se considera probable, a pesar de que el tiempo y las diferencias funcionales, debidas a presiones de adaptación diferentes, puedan haber borrado muchas relaciones secuenciales reveladoras.

Una familia de proteínas puede encontrarse repartida en los tres dominios de vida celular: Bacteria, Arquea i Eucaria, lo que sugeriría un origen muy antiguo. Muchas proteínas involucradas en el metabolismo intermediario y en el metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas pertenecen a esta categoría. Otras familias pueden estar presentes en tan solo un número pequeño de organismos, lo que indicaría que su estructura apareció más recientemente. La reconstrucción de la historia natural de los motivos estructurales utilizando las clasificaciones de bases de datos estructurales como SCOP2 aporta un poderoso complemento a los análisis de secuencias y permite definir muchas relaciones evolutivas. La base de datos SCOP2 es mantenida manualmente con el objeto de ubicar las proteínas en el marco evolutivo correcto en base a características estructurales conservadas.

En la definición de las familias y superfamilias de proteínas, los motivos estructurales son muy importantes. La mejora en los sistemas de clasificación y comparación de proteínas, lleva inevitablemente al descubrimiento de nuevas relaciones funcionales. Dado el papel central de las proteínas en los sistemas vivos, estas comparaciones estructurales pueden ayudar a esclarecer todos los aspectos bioquímicos, desde la evolución de las proteínas individuales hasta la historia evolutiva de rutas metabólicas enteras.

Las estructuras cuaternarias de las proteínas comprenden desde dímeros sencillos hasta grandes complejos

Muchas proteínas presentan múltiples subunidades polipeptídicas (desde dos a centenares de ellas). La asociación de cadenas polipeptídicas puede servir para una diversidad de funciones. Muchas proteínas con múltiples subunidades tienen funciones reguladoras; la unión de moléculas pequeñas puede alterar la interacción entre subunidades produciendo grandes cambios en la actividad de la proteína en respuesta a pequeños cambios en la concentración de sustrato o moléculas reguladoras (Capítulo 6). En otros casos, subunidades diferentes pueden llevar a cabo funciones separadas aunque relacionadas, tales como la catálisis y la regulación. Algunas asociaciones, como por ejemplo las proteínas fibrosas descritas al inicio de este capítulo y las proteínas de la cubierta de los virus, tienen principalmente una función estructural. Algunas estructuras grandes son el sitio donde tienen lugar reacciones complejas con diversos pasos. Por ejemplo, cada uno de los ribosomas, sitio donde se produce la síntesis de proteínas, incorpora docenas de subunidades de proteínas junto con varias moléculas de RNA.

Una proteína con múltiples subunidades se conoce también como **multímero**. Un multímero con sólo unas pocas subunidades se denomina a menudo **oligómero**. Si un multímero está constituido por subunidades diferentes, la estructura global de la proteína puede ser asimétrica y bastante complicada. Sin embargo, la mayoría de los multímeros tienen subunidades idénticas o grupos repetidos de subunidades no idénticas a menudo dispuestos simétricamente. Como se dijo en el Capítulo 3, la unidad de repetición estructural en este tipo de proteína multimérica, tanto si es una sola subunidad o un grupo de subunidades, se denomina **protómero**.

La hemoglobina (M_r 64.500) fue la primera proteína oligomérica de la que se determinó la estructura tridimensional. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas y cuatro grupos prostéticos hemo, en los que los átomos de hierro se encuentran en el estado ferroso (Fe^{2+}) (Fig. 4-17). La parte proteica, la globina, está constituida por dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). Obsérvese que α y β no se refieren en este caso a estructuras secundarias. Según una costumbre que puede resultar confusa para el principiante, las letras



Max Perutz, 1914-2002 (izquierda) y John Kendrew, 1917-1997 [Fuente: Corbis/Hulton Deutsch Collection.]

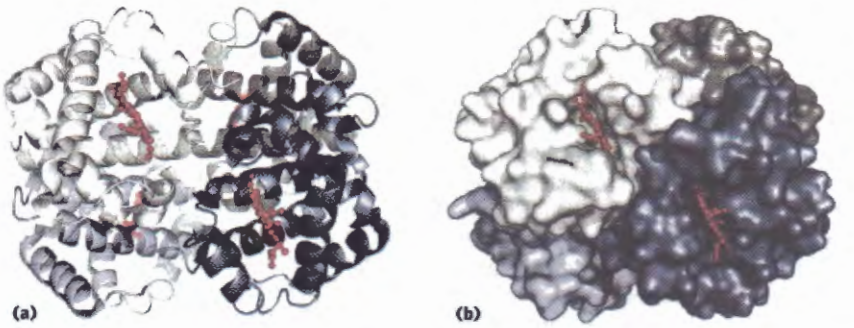


FIGURA 4-24 Estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. (PDB ID 2HHB) El análisis de difracción de rayos X de la desoxihemoglobina (hemoglobina sin moléculas de oxígeno unidas a los grupos hemo) muestra cómo se empaquetan juntas las cuatro subunidades polipeptídicas. **(a)** La representación de cintas muestra los elementos de estructura secundaria y la posición de todos los cofactores hemo. **(b)** El modelo de contorno espacial muestra las hendiduras en las que se unen los cofactores hemo y es útil para visualizar el empaquetamiento de las subunidades. Las subunidades α se muestran en tonos de gris; las subunidades β en tonos de azul. Obsérvese que los grupos hemo (rojo) están relativamente alejados. [Fuente: PDB ID 2HHB, G. Fermi et al., *J. Mol. Biol.* 175:159, 1984.]

griegas α y β (y γ y δ, y otras) se usan a menudo para distinguir tipos diferentes de subunidades dentro de una proteína multimérica, independientemente del tipo de estructura secundaria que predomine en las subunidades. Puesto que la hemoglobina es cuatro veces más grande que la mioglobina, fueron necesarios mucho más tiempo y esfuerzos para resolver su estructura tridimensional por análisis de rayos X, lo que consiguieron finalmente Max Perutz, John Kendrew y sus colaboradores en 1959. Las subunidades de hemoglobina están dispuestas en pares simétricos **(Fig. 4-24)** que contienen cada uno una subunidad α y una subunidad β. Por tanto la hemoglobina se puede describir como un tetrámero o como un dímero de protómeros $\alpha\beta$. En el Capítulo 5 se discute el papel jugado por las subunidades en la función de la hemoglobina.

RESUMEN 4.3 Estructura terciaria y cuaternaria de proteínas

- La estructura terciaria es la estructura tridimensional completa de una cadena polipeptídica. Muchas proteínas pertenecen a una de las dos clases generales de proteínas en base a la estructura terciaria: fibrosas y globulares
- Las proteínas fibrosas, que desempeñan mayoritariamente papeles estructurales, están formadas por elementos repetitivos simples de estructura secundaria
- Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias más complicadas que a menudo contienen varios tipos de estructura secundaria en la misma cadena polipeptídica. La primera proteína globular cuya estructura se determinó mediante métodos de difracción de rayos X fue la mioglobina.
- Las complejas estructuras de las proteínas globulares pueden analizarse examinando los modelos de plegamiento denominados motivos (también llamados plegamientos o estructuras supersecundarias). Los miles de estructuras proteicas conocidas suelen estar construidas a partir de un repertorio de sólo unos pocos centenares de motivos. Los dominios son regiones de la cadena polipeptídica que pueden plegarse de forma estable e independiente.
- Algunas proteínas o segmentos de proteína son intrínsecamente desordenados y carecen de estructura definida. Estas proteínas tienen una composición de aminoácidos particular que permite una estructura más flexible. Algunas de estas proteínas desordenadas funcionan como componentes estructurales o como moléculas recolectoras; otras pueden interactuar con muchas proteínas diferentes, funcionando como inhibidores versátiles o como componentes centrales de redes de interacciones proteicas. La estructura cuaternaria se forma como consecuencia de interacciones entre las subunidades de proteínas con múltiples subunidades (multiméricas) o de grandes complejos proteicos. Algunas proteínas multiméricas poseen una unidad repetitiva consistente en una única subunidad o en un grupo de subunidades que se denomina protómero

4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

La vida de las proteínas es sorprendentemente precaria. Ya hemos visto que la conformación nativa es tan solo marginalmente estable. Además, muchas proteínas necesitan mantener la flexibilidad conformacional para funcionar. El mantenimiento continuo del conjunto de proteínas celulares activas necesarias en unas condiciones dadas se denomina **proteostasis**. La proteostasis celular implica la coordinación de las rutas de síntesis de proteínas y de su plegamiento, el replegamiento de proteínas parcialmente desplegadas y la recogida y degradación de las proteínas que se han desplegado irreversiblemente. Estas redes de procesos implican a cientos de enzimas y proteínas especializadas en todas las células.

Como hemos visto en la **Figura 4-25**, la vida de una proteína implica mucho más que su síntesis y degradación posterior. La estabilidad marginal de muchas proteínas puede generar un tenue equilibrio entre estados plegado y desplegado. Al sintetizarse en los ribosomas (Capítulo 27) las proteínas deben plegarse en sus conformaciones nativas. Esto ocurre espontáneamente en ocasiones, pero es más habitual que tenga lugar gracias a la asistencia de enzimas y complejos especializados llamados chaperonas. Muchos de estos ayudantes del plegamiento actúan en el replegamiento de proteínas que se han desplegado de manera transitoria. Las proteínas que no están correctamente plegadas suelen

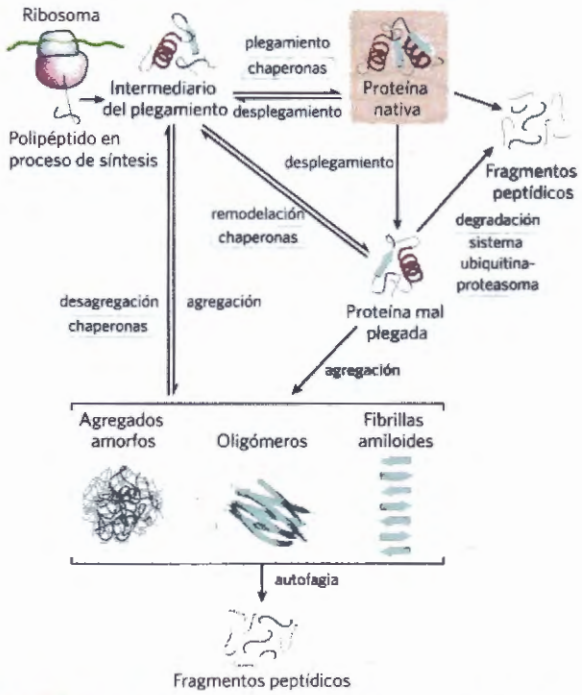


FIGURA 4-25 Rutas que contribuyen a la proteostasis. Tres tipos de procesos contribuyen a la proteostasis, en algunos casos con múltiples rutas confluyentes. En primer lugar, las proteínas se sintetizan en el ribosoma. En segundo lugar, múltiples rutas contribuyen al plegamiento de las proteínas, muchas de las cuales implican la actividad de complejos llamados chaperonas. Las chaperonas (incluidas las chaperoninas) también contribuyen al replegamiento de las proteínas que están parcial o transitoriamente desplegadas. Finalmente, las proteínas irreversiblemente desplegadas son secuestradas y degradadas a través de varias rutas adicionales. Las proteínas parcialmente desplegadas y los intermediarios del plegamiento de proteínas que escapan a las actividades de control de calidad de las chaperonas y de las rutas degradativas pueden agregarse, formando tanto agregados desordenados como agregados ordenados de tipo amiloide que producen enfermedades y contribuyen a los procesos de envejecimiento. [Fuente: Información de F.U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 6.]

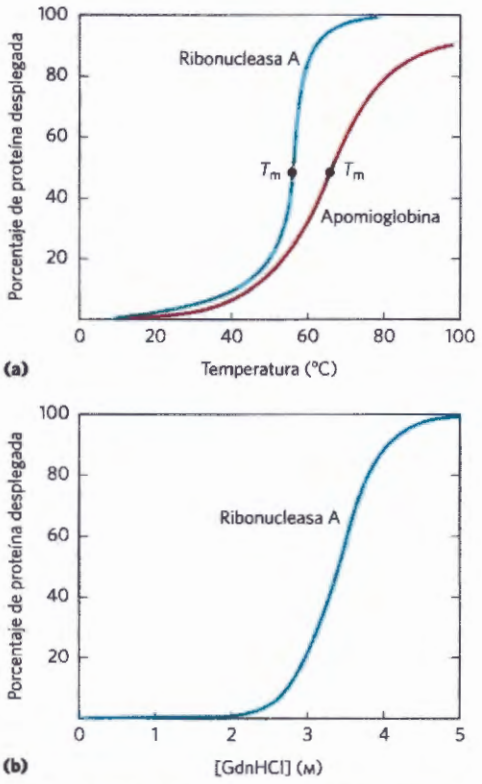


FIGURA 4-26 Desnaturalización de proteínas. Se muestran los resultados para proteínas desnaturalizadas mediante dos tipos de cambios del entorno. En cada caso, la transición del estado plegado al desplegado es muy abrupta, sugiriendo que existe cooperatividad en el proceso de desplegamiento. **(a)** Desnaturalización térmica de la apomioglobina de caballo (mioglobina sin el grupo prostético hemo) y ribonucleasa A (con los enlaces disulfuro intactos; véase la Fig. 4-27). El punto medio en el intervalo de temperaturas en el que tiene lugar la desnaturalización se denomina temperatura de fusión o T_m. La desnaturalización de la apomioglobina se siguió mediante dicroísmo circular (véase la Fig. 4-10), una técnica que mide la cantidad de estructura helicoidal en una macromolécula. La desnaturalización de la ribonucleasa A se siguió midiendo los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína, la cual se ve afectada por los cambios de entorno de los residuos de Trp. **(b)** Desnaturalización de la ribonucleasa A con los enlaces disulfuro intactos mediante cloruro de guanidinio (GdnHCl), seguida mediante dicroísmo circular. [Fuentes: (a) Datos de R.A. Sendak et al., *Biochemistry*, 35:12, 978, 1996; I. Nishii et al., *J. Mol. Biol.* 250:223, 1995. (b) Datos de W.A. Houry et al., *Biochemistry* 35:10,125, 1996.]

exponer al exterior superficies hidrofóbicas que las convierte en "adhesivas" y conducen a la formación de agregados inactivos. Estos agregados pueden no ser inertes a pesar de haber perdido su funcionalidad normal; su acumulación en las células es la base de enfermedades que van desde la diabetes a las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. No es por tanto sorprendente que todas las células posean rutas elaboradas para reciclar o degradar proteínas que están plegadas incorrectamente de manera irreversible.

Las transiciones entre los estados plegado y desplegado y la red de rutas e interacciones que controlan estas transiciones constituyen ahora el centro de nuestra atención.

La pérdida de la estructura proteica conduce a la pérdida de función

Las estructuras proteicas han evolucionado para funcionar en entornos celulares concretos. Condiciones diferentes a las de la célula pueden provocar cambios, grandes y pequeños, en la estructura de la proteína. La pérdida de estructura tridimensional suficiente para originar la pérdida de la función se denomina **desnaturalización**. El estado desnaturalizado no se equipara necesariamente con el desplegamiento completo de la proteína y la pérdida total de la conformación. En la mayoría de condiciones, las proteínas desnaturalizadas existen como un conjunto de estados parcialmente plegados.

La mayoría de las proteínas se pueden desnaturalizar mediante calor, el cual afecta de una manera compleja a las interacciones débiles de una proteína (los enlaces de hidrógeno principalmente). Si se aumenta lentamente la temperatura, la conformación de la proteína suele permanecer intacta hasta que tiene lugar una pérdida brusca de la estructura (y de la función) dentro de un estrecho margen de temperaturas **(Fig. 4-26)**. La brusquedad del cambio sugiere que el desplegamiento es un proceso cooperativo: la pérdida de

estructura en una parte de la proteína desestabiliza otras partes. La estructura puede mitigar el efecto del calor sobre las proteínas. Las proteínas muy estables al calor de las bacterias y arqueas termófilas han evolucionado para poder funcionar a la temperatura de las fuentes termales (~100 °C). Las estructuras plegadas de estas proteínas suelen ser similares a las de las proteínas de otros organismos, aunque llevan al extremo algunos de los principios aquí descritos. Presentan con frecuencia una elevada densidad de residuos cargados en su superficie, núcleos hidrofóbicos más compactos en su interior y poseen plegamientos menos flexibles a causa de redes de pares iónicos, lo que en conjunto convierte a estas proteínas en menos susceptibles al desplegamiento a elevadas temperaturas.

La desnaturalización de proteínas también puede llevarse a cabo por la acción de extremos de pH, de ciertos disolventes orgánicos miscibles en agua como por ejemplo el alcohol o la acetona, de ciertos solutos tales como la urea o el cloruro de guanidinio, o mediante detergentes. El tratamiento con cada uno de estos agentes desnaturalizantes puede considerarse relativamente suave, en el sentido de que no se rompen enlaces covalentes de la cadena polipeptídica. Los disolventes orgánicos, la urea y los detergentes actúan principalmente rompiendo las interacciones hidrofóbicas que forman el núcleo estable de las proteínas globulares; la urea también rompe los enlaces de hidrógeno; los extremos de pH alteran la carga neta de la proteína, dando lugar a la aparición de repulsiones electrostáticas y a la destrucción de algunos enlaces de hidrógeno. Las estructuras desnaturalizadas obtenidas con estos diversos tratamientos no son necesariamente equivalentes.

La desnaturalización suele dar lugar a la precipitación de la proteína, una consecuencia de la formación de agregados proteicos al asociarse las superficies hidrofóbicas expuestas. Los agregados suelen estar altamente desordenados. Un ejemplo de ello es el precipitado de proteína que se observa en la clara del huevo hervida. En algunas proteínas se observan agregados más ordenados, como veremos.

La secuencia de aminoácidos determina la estructura terciaria

La estructura terciaria de una proteína globular está determinada por su secuencia de aminoácidos. La prueba más importante vino de experimentos que demostraron que la desnaturalización de algunas proteínas es reversible. Algunas proteínas globulares desnaturalizadas por el calor, extremos de pH o reactivos desnaturalizantes, son capaces de recuperar su estructura nativa y su actividad biológica si son devueltas a condiciones en las que la conformación nativa es estable. Este proceso se conoce como **renaturalización**.

Un ejemplo clásico es la desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa A, demostrada por Christian Anfinsen en la década de 1950. La ribonucleasa A purificada se desnaturaliza completamente mediante exposición a una disolución concentrada de urea en presencia de un agente reductor. El agente reductor rompe los cuatro puentes disulfuro dando lugar a ocho residuos de Cys y la urea elimina el efecto hidrofóbico estabilizante, con lo que el polipéptido

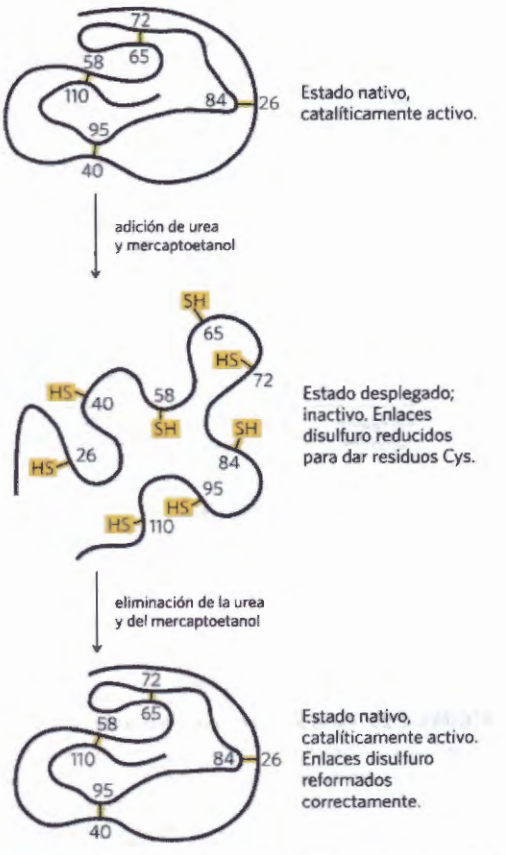


FIGURA 4-27 Renaturalización de la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada. La urea desnaturaliza la ribonucleasa y el mercaptoetanol ($HOCH_2CH_2SH$) la reduce, rompiendo los enlaces disulfuro y generando ocho residuos Cys. La renaturalización implica la restauración de los enlaces disulfuro correctos.

pierde completamente su conformación plegada. La desnaturalización de la ribonucleasa va acompañada de una pérdida completa de la actividad catalítica. Cuando se eliminan la urea y el agente reductor, la ribonucleasa desplegada y desnaturalizada se vuelve a plegar espontáneamente adoptando su estructura terciaria correcta y recuperando completamente su actividad catalítica **(Fig. 4-27)**. El replegamiento de la ribonucleasa es tan exacto que los cuatro puentes disulfuro intracatenarios de la molécula renaturalizada se forman en las mismas posiciones originales observadas en la ribonucleasa nativa. Más adelante se obtuvieron resultados similares usando ribonucleasa A sintetizada químicamente y catalíticamente activa. Con esto se eliminaba la posibilidad de que algún contaminante residual de la preparación de ribonucleasa de Anfinsen hubiera podido contribuir a la renaturalización del enzima, disipando cualquier duda sobre la capacidad de plegamiento espontáneo del enzima.

El experimento de Anfinsen demostró por primera vez que la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica contiene toda la información necesaria para el plegamiento de la cadena en su estructura tridimensional nativa. Trabajos posteriores han demostrado que sólo una minoría de proteínas, muchas de ellas pequeñas e inherentemente estables, se pliegan espontáneamente para dar lugar a su forma nativa. A pesar de

que todas las proteínas poseen realmente el potencial para plegarse y generar su estructura nativa, muchas requieren algún tipo de asistencia.

Los polipéptidos se pliegan rápidamente según un proceso en varias etapas

En las células vivas, las proteínas se forman a partir de los aminoácidos a una gran velocidad. Por ejemplo, las células de *E. coli* pueden producir una molécula de proteína entera y biológicamente activa de 100 residuos aminoácidos en aproximadamente 5 segundos a 37° C. Sin embargo, la síntesis de enlaces peptídicos en el ribosoma no es suficiente; la proteína debe plegarse.

¿Cómo alcanza esta cadena polipeptídica su conformación nativa? Vamos a suponer, en un cálculo a la baja, que cada residuo aminoácido puede adoptar una media de 10 conformaciones diferentes, lo que origina 10^{100} conformaciones diferentes del polipéptido. Supongamos también que la proteína se pliega espontáneamente mediante un proceso al azar en el que ensaya todas las conformaciones posibles en torno de cada enlace sencillo de su esqueleto peptídico hasta encontrar su forma nativa biológicamente activa. Si cada conformación se ensayara en el período de tiempo más corto posible ($\sim 10^{-13}$ segundos, o sea el tiempo requerido para una sola vibración molecular), probar todas las conformaciones posibles requeriría unos 10^{77} años. Está claro, pues, que el plegamiento de proteínas no puede ser un proceso completamente al azar en el que se siga el método de prueba y error. Deben existir atajos para el plegamiento. Este problema fue señalado por primera vez en 1968 por Cyrus Levinthal y a menudo se denomina la paradoja de Levinthal.

La ruta de plegamiento de una cadena polipeptídica grande es, sin ningún género de dudas, muy complicada. Sin embargo, el rápido progreso en este campo ha permitido generar algoritmos potentes capaces a menudo de predecir la estructura de proteínas pequeñas a partir de su secuencia de aminoácidos. Las rutas principales del plegamiento están jerarquizadas. En primer lugar se formarían las estructuras secundarias locales. Ciertas secuencias de aminoácidos se pliegan rápidamente en forma de hélices α u hojas β guiadas por las restricciones que hemos revisado en nuestra discusión sobre la estructura secundaria. Las interacciones iónicas, en las que intervienen grupos cargados situados, a menudo, unos cerca de otros en la secuencia lineal del polipéptido, pueden jugar un papel importante en la conducción de estos primeros pasos del plegamiento. Después de la formación de las estructuras locales se establecen las interacciones de largo alcance entre, por ejemplo, dos elementos de estructura secundaria que se acercan para formar estructuras plegadas estables. El efecto hidrofóbico juega un papel importante a lo largo del proceso, ya que la formación de agregados entre cadenas laterales apolares de aminoácidos proporciona una estabilización entrópica para los intermedios y, en último término, para la estructura plegada final. El proceso continúa hasta la completa formación de dominios y el plegamiento del polipéptido entero **(Fig. 4-28)**. Es destacable el hecho de que las proteínas dominadas por interacciones de corto alcance (entre pares de residuos generalmente cercanos en la cadena polipeptídica) tienden a plegarse

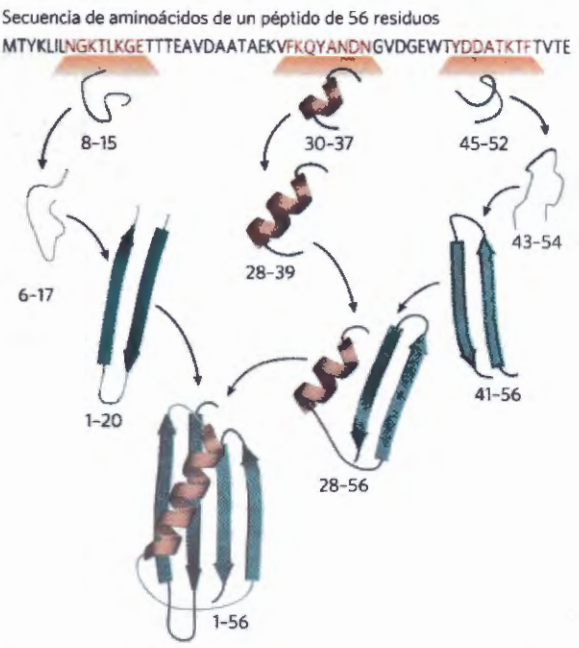


FIGURA 4-28 La ruta de plegamiento de una proteína pequeña. Se muestra una ruta jerarquizada basada en simulaciones por computador. En primer lugar se forman pequeñas regiones de estructura secundaria, que más adelante se incorporan a estructuras de orden superior. El programa usado para este modelo ha resultado muy eficiente en la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas pequeñas a partir de su secuencia de aminoácidos. Los números indican residuos aminoácidos de este péptido de 56 residuos que han adquirido su estructura final en cada uno de los pasos mostrados. [Fuente: Información de K.D. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 5.]

más rápidamente que las que tienen un plegamiento más complejo y muchas interacciones de largo alcance entre los diferentes segmentos. Al sintetizarse proteínas mayores con múltiples dominios, aquellos dominios que se encuentran cerca del extremo amino terminal (los que se sintetizan primero) pueden plegarse antes de que se haya sintetizado todo el polipéptido.

El proceso de plegamiento se puede representar, termodinámicamente, como una especie de embudo de energía libre **(Fig. 4-29)**. Los estados desplegados se caracterizan por un elevado grado de entropía conformacional y una energía libre relativamente elevada. A medida que el plegamiento avanza, el estrechamiento del embudo refleja la disminución del espacio conformacional accesible a la proteína mientras se aproxima al estado nativo. Las pequeñas depresiones a lo largo de las caras del embudo de energía libre representan intermediarios semiestables que pueden enlentecer momentáneamente el proceso de plegamiento. El conjunto de intermediarios del plegamiento se reduce, en el fondo del embudo, a una única conformación nativa (o una dentro de un pequeño conjunto de conformaciones nativas). Los embudos pueden presentar diversas formas en función de la complejidad de la ruta de plegamiento, la existencia de intermediarios semiestables y el potencial que pueda tener alguno de ellos para constituirse en forma de agregados de proteínas mal plegadas (Fig. 4-29).

La estabilidad termodinámica no se distribuye de modo uniforme en la estructura de una proteína: la

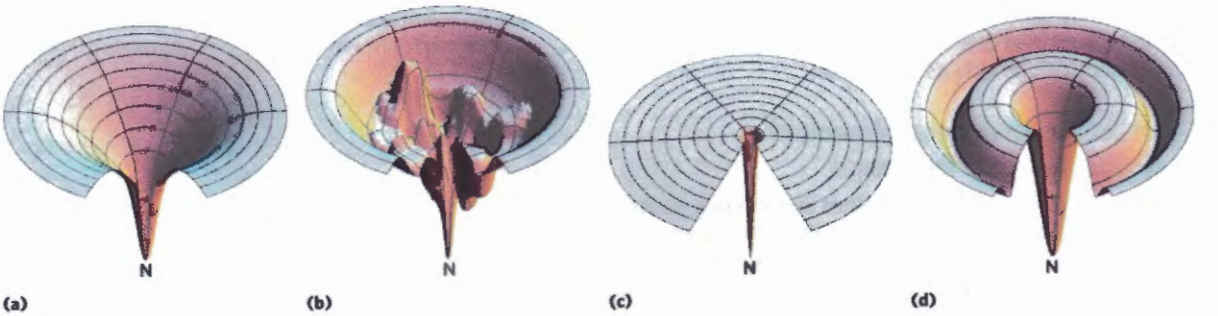


FIGURA 4-29 Termodinámica del plegamiento de una proteína representada como embudos de energía libre. Al plegarse las proteínas, el espacio conformacional que puede explorarse se constriñe. Este espacio de modela como un embudo termodinámico tridimensional, en el que ΔG se representa como su profundidad y donde la estructura nativa (N) se sitúa en el fondo del embudo (punto de menor energía libre). El embudo puede adoptar diversas formas que dependen de cada proteína y del número y tipo de intermediarios en las rutas de plegamiento. Todo intermediario con estabilidad significativa y de vida finita se representará como un mínimo local de energía libre (una depresión en la superficie del embudo). **(a)** Un embudo simple pero relativamente amplio y liso representa una proteína con vías de plegamiento múltiples (es decir, para la que el orden de plegamiento de cada una de las partes sería en cierto modo al azar), pero que adopta su estructura tridimensional sin que haya intermediarios del plegamiento significativamente estables. **(b)** Este embudo es representativo de una proteína más típica, que tiene múltiples intermediarios posibles del plegamiento significativamente estables en múltiples rutas que conducen a la estructura nativa. **(c)** Una proteína con una estructura nativa estable, sin intermediarios de plegamiento con estabilidad significativa y que tiene tan solo una ruta de plegamiento o un número muy limitado de ellas, se representa como un embudo con una depresión estrecha que conduce a la forma nativa. **(d)** Una proteína con intermediarios de plegamiento de elevada estabilidad en prácticamente todas las rutas que conducen al estado nativo (es decir, una proteína en la que un motivo o dominio particular se pliega siempre rápidamente pero en la que otras partes de la misma se pliegan más lentamente y al azar) se representa como una embudo con una depresión grande que rodea a la depresión que conduce a la forma nativa. [Fuente: Información de K.D. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 9.]

molécula tiene regiones de estabilidad relativamente alta y otras de baja o nula estabilidad. Una proteína puede, por ejemplo, tener dos dominios estables unidos por un segmento completamente desordenado. Las regiones de estabilidad baja pueden permitir que la conformación de la proteína fluctúe entre dos o más estados. Como veremos en los dos capítulos siguientes, las variaciones en la estabilidad de las regiones dentro de una proteína suelen ser esenciales para la función. Las proteínas o los fragmentos de proteína intrínsecamente desordenados no se pliegan en absoluto.

Al ir creciendo nuestra comprensión del plegamiento y de la estructura de las proteínas se van desarrollando programas informáticos cada vez más sofisticados para predecir la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos. La predicción de estructura de proteínas es un campo especializado de la bioinformática cuyo progreso se evalúa bianualmente en la competición CASP (Critical Assessment of Structural Prediction – Evaluación crítica de predicción estructural). Participantes de todo el mundo rivalizan en la predicción de la estructura de una proteína determinada (cuya estructura se conoce pero todavía no se ha publicado). Se invita a los equipos que se aproximan más al resultado correcto a presentar sus resultados en la conferencia CASP. Estos esfuerzos tienen un éxito creciente, siendo ya habituales la predicciones correctas para proteínas pequeñas.

Algunas proteínas experimentan un plegamiento asistido

No todas las proteínas se pliegan espontáneamente a medida que se sintetizan en la célula. Para el plegamiento de muchas proteínas es necesaria la acción de las **chaperonas**, proteínas que interaccionan con polipéptidos parcial o incorrectamente plegados, facilitando rutas de plegamiento correctas o aportando microambientes en los que pueda tener lugar el plegamiento. Existen diversos tipos de chaperonas moleculares en organismos que van desde las bacterias hasta los humanos. Las dos familias principales y mejor estudiadas de chaperonas son la familia de las **Hsp70** y las **chaperoninas**.

La familia de las Hsp70 presenta generalmente una masa molecular cercana a 70.000 y son más abundantes en células sometidas a estrés por temperaturas elevadas (de aquí, proteínas de choque térmico -por *h*eat *s*hock *p*roteins- de M_r 70.000 o Hsp70). Las proteínas Hsp70 se unen a regiones ricas en residuos hidrofóbicos de polipéptidos no plegados. Por tanto estas chaperonas "protegen" tanto las proteínas que se han desnaturalizado por calor como los péptidos que se están sintetizando (y que aún no están plegados). Las proteínas Hsp70 también bloquean el plegamiento de determinadas proteínas que deben permanecer desplegadas hasta que hayan sido traslocadas a través de una membrana (descritas en el Capítulo 27). Algunas chaperonas también ayudan en el empaquetamiento cuaternario de proteínas oligoméricas. Las proteínas Hsp70 se unen a polipéptidos y los liberan en un ciclo que usa la energía de la hidrólisis del ATP y en el que también intervienen otras muchas proteínas (incluidas las de una familia llamada Hsp40). En la **Figura 4-30** se muestra el plegamiento asistido por chaperonas tal como se ha deducido para las chaperonas Hsp70 y Hsp40. La unión de un polipéptido desplegado a una chaperona Hsp70 puede disgregar un agregado proteico o evitar la formación de uno nuevo. Después de su liberación, el polipéptido unido puede reemprender el plegamiento hacia su estructura nativa. Si su plegamiento no se da con la suficiente rapidez, el polipéptido puede unirse otra vez a la chaperona para repetir el proceso. De manera alternativa, el polipéptido unido a Hsp70 puede ser transferido a una chaperonina.

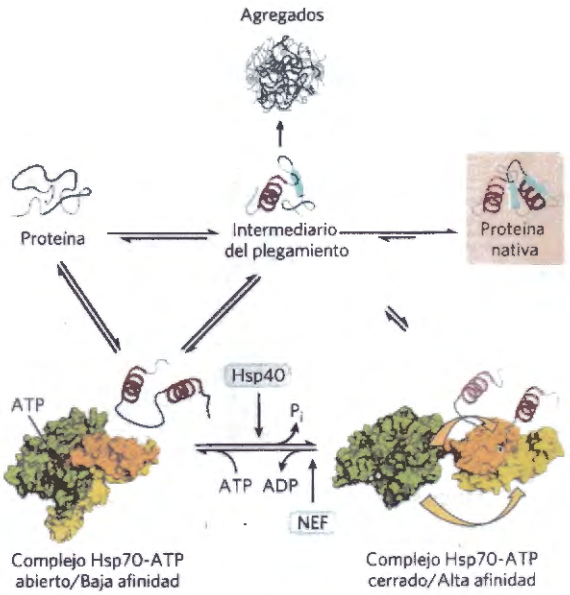


FIGURA 4-30 Las chaperonas en el plegamiento de las proteínas. El proceso por el que las chaperonas de la clase Hsp70 se unen a polipéptidos y los liberan se ilustra en la figura para las chaperona eucarióticas Hsp70 y Hsp40. Las chaperonas no promueven activamente el plegamiento de la proteína sustrato sino que evitan la agregación de los polipéptidos desplegados. Las proteínas desplegadas o parcialmente plegadas se unen en primer lugar a la forma abierta y unida a ATP de Hsp70. A continuación, Hsp40 interacciona con este complejo e induce la hidrólisis del ATP, lo que da lugar a la forma cerrada del complejo, en la que los dominios de color naranja y amarillo se cierran como dos mandíbulas y atrapan en su interior partes de la proteína desplegada. Para la disociación del ADP y el reciclaje de Hsp70 se necesita la intervención de otra proteína, el factor de intercambio de nucleótidos (NEF). En una población dada de moléculas de polipéptido, una fracción de las moléculas liberadas después la unión transitoria de las proteínas parcialmente plegadas a Hsp70 adoptará la conformación nativa. El resto volverá a unirse a Hsp70 o será dirigido al sistema de las chaperoninas (Hsp60, véase la Fig. 4-31). En bacterias, las chaperonas Hsp70 y Hsp40 se denominan, respectivamente, DnaK y DnaJ. Su nombre deriva del hecho de que su identificación inicial de produjo al encontrar que eran proteínas necesarias para la replicación in vitro de ciertas moléculas de DNA vírico (de ahí la designación Dna). [Fuentes: Información de F.U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 2. Complejo Hsp70-ATP abierto: PDB ID 2QXL, Q. Liu y W.A. Hendrickson, Cell 131:106, 2007. Complejo Hsp70-ATP cerrado: derivado de PDB ID 2KHO, E. B. Bertelson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:8471, 2009, y PDB ID 1DKZ, X. Zhu et al., *Science* 272:1606, 1996.]

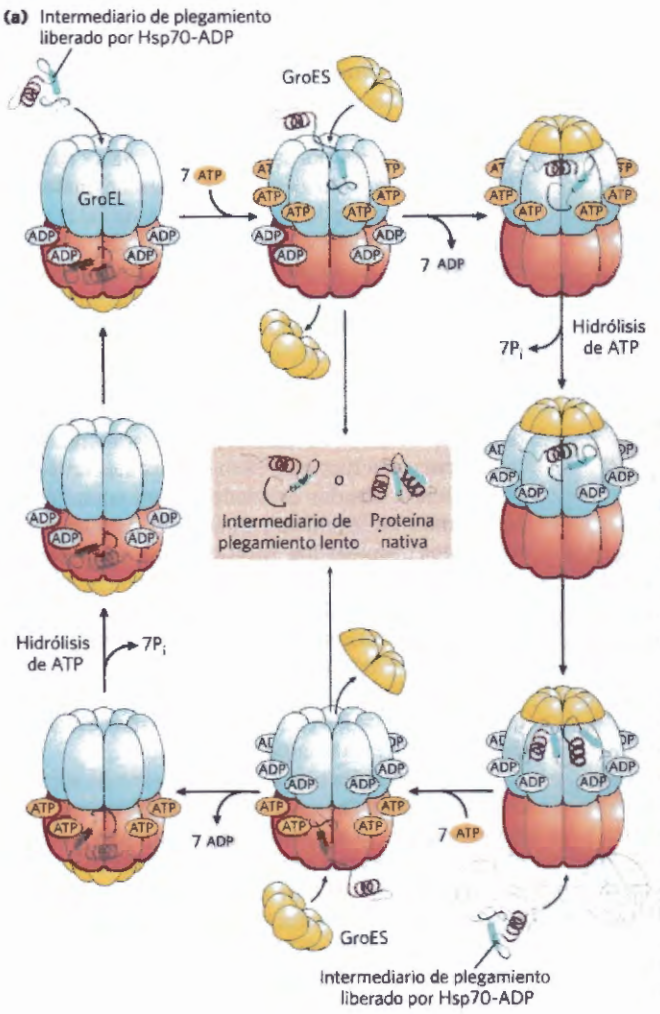
Las chaperoninas son elaborados complejos proteicos necesarios para el plegamiento de algunas proteínas celulares que no se pliegan espontáneamente. Se calcula que en *E.coli* entre un 10 y un 15% de proteínas celulares necesitan el sistema propio de chaperonina, denominado GroEL/GroES, para plegarse en condiciones normales (hasta un 30% de proteínas necesitan esta asistencia cuando las células se someten a estrés por calor). El sistema análogo de chaperoninas eucariótico se llama Hsp60. Las chaperoninas se descubrieron cuando se observó que eran necesarias para el crecimiento de ciertos virus bacterianos (de aquí la designación "Gro", *gro*wth). Estas chaperonas adoptan la estructura de una serie de anillos con múltiples subunidades que forman dos cámaras orientadas de manera que sus dos caras posteriores quedan juntas. Una proteína desplegada se une en primer lugar a una superficie hidrofóbica expuesta cerca del extremo apical de una de las cámaras de GroEL. La proteína queda atrapada en el interior de la cavidad cuando ésta queda transitoriamente cubierta por la "tapa" de GroES **(Fig. 4-31)**. GroEL experimenta cambios conformacionales importantes acoplados a la hidrólisis lenta de ATP, que también regula la unión y liberación de GroES. Dentro de la cavidad una proteína tiende aproximadamente 10 segundos para plegarse, el tiempo requerido para que se hidrolice el ATP unido. El confinamiento de una proteína dentro de la cavidad evita la agregación proteica y restringe el espacio conformacional explorable por el polipéptido al plegarse. La proteína se libera cuando se disocia la cubierta de GroES, pero puede unirse rápidamente para efectuar otro ciclo si no se ha completado el plegamiento. Las dos cavidades de un complejo GroEL se alternan en la unión y liberación de sustratos polipeptídicos desplegados. En eucariotas, el sistema Hsp60 utiliza un proceso similar para plegar proteínas. Sin embargo, en lugar de la tapa de GroES, son las extensiones de los dominios apicales de las subunidades las que se flexionan y cubren la cavidad. El ciclo hidrolítico del ATP es también más lento en los complejos Hsp60, lo que permite que las proteínas confinadas en su interior dispongan de más tiempo para plegarse.

Finalmente, las rutas de plegamiento de algunas proteínas necesitan dos enzimas que catalizan reacciones de isomerización. **La proteína disulfuro isomerasa (PDI)** es un enzima ampliamente distribuido que cataliza el intercambio o la mezcla de enlaces disulfuro hasta que se forman los enlaces de la conformación nativa. Entre sus funciones, la PDI cataliza la eliminación de los intermedios de plegamiento con entrecruzamientos de disulfuros incorrectos. La **péptido prolil cis-trans isomerasa (PPI)** cataliza la interconversión entre los isómeros cis y trans de los enlaces peptídicos de residuos Pro (Fig. 4-8), que puede ser una etapa lenta del proceso de plegamiento de proteínas que contienen algunos enlaces peptídicos de Pro en la conformación cis.

Defectos en el plegamiento de proteínas constituyen la base molecular de una amplia gama de enfermedades genéticas humanas

A pesar de que hay muchos procesos que colaboran en el plegamiento de las proteínas, algunas proteínas se pliegan erróneamente. De hecho, el plegamiento incorrecto de proteínas es un problema importante en todas las células, por el que una cuarta parte o más de los polipéptidos sintetizados pueden ser destruidos a causa de su plegamiento incorrecto. En algunos casos, el plegamiento incorrecto contribuye al desarrollo de enfermedades graves.

Muchas enfermedades, entre las que se incluye la diabetes del tipo 2 y las enfermedades de Alzheimer, de Huntington y de Parkinson, están asociadas a un mecanismo de plegamiento incorrecto: una proteína soluble que normalmente se secreta de la célula lo hace en un estado plegado incorrecto y se convierte en una fibra **amiloide** insoluble extracelular. Estas enfermedades reciben el nombre colectivo de **amiloidosis**. Las fibras están muy ordenadas y sin ramificar, con un diámetro



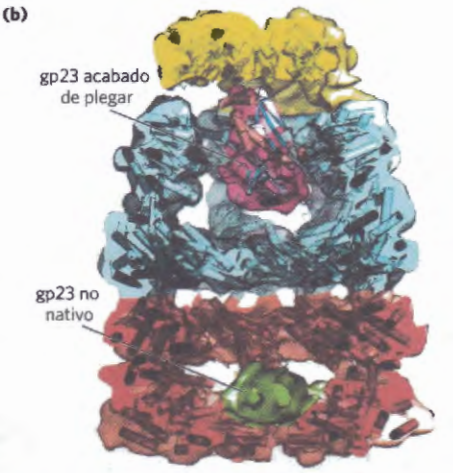


FIGURA 4-31 Las chaperoninas en el plegamiento de proteínas. **(a)** Ruta propuesta para la actuación de las chaperoninas de *E. coli*, GroEL (un miembro de la familia de proteínas Hsp60) y GroES. Cada complejo GroEL está formado por dos grandes cámaras o cavidades formadas por dos anillos heptaméricos (cada subunidad tiene un M_r de 57.000). GroES, es también un heptámero (subunidades de M_r 10.000) y bloquea una de las cámaras de GroEL después de que una proteína desplegada se haya unido en su interior. La cámara que contiene la proteína desplegada se denomina cis y la cámara opuesta trans. El plegamiento se produce en la cámara cis, durante el tiempo que toma la hidrólisis de los 7 ATP unidos a las subunidades del anillo heptamérico. A continuación, las moléculas de ADP y GroES se disocian y se libera la proteína. Las dos cámaras de los sistemas GroEL/Hsp60 se alternan en la unión y plegamiento facilitado de proteínas. **(b)** Imagen de un corte transversal del complejo GroEL/GroES. La estructura secundaria α-helicoidal se representa en forma de cilindros dentro de una estructura de superficie transparente. Se muestra una proteína plegada (gp23) dentro del gran espacio interior de la cámara superior; en la cámara inferior se muestra una versión no plegada de gp23. [Fuentes: (a) Información de F.U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 3. (b) Vista de la superficie de GroEL/GroES con gp23 desplegada: EMBD-1548, D.K. Clare et al., *Nature* 457:107, 2009; GroEL/GroES:PDB ID 2CGT, D.K. Clare et al., *J. Mol. Biol.* 358:905, 2006; gp23 plegado: PDB ID 1YUE, A. Fokine et al., *Proc. Natl. Scad. Sci. USA* 102:7163, 2005.]

de 7 a 10 nm y un grado elevado de estructura β. Los segmentos β están orientados perpendicularmente al eje de la fibra. En algunas fibras amiloides la estructura global forma una hoja β de dos capas como la que se muestra para el péptido β-amiloide en la **Figura 4-32**.

Muchas proteínas pueden adoptar la estructura fibrilar amiloide como alternativa a sus conformaciones plegadas normales, y la mayoría de ellas concentran residuos aromáticos en una región central de una hoja β o una hélice α. Las proteínas se secretan en una conformación parcialmente plegada. Antes de que el resto de la proteína se pliegue correctamente, el núcleo (o parte de él) se pliega en forma de hoja β (o alguna parte de él) y las hojas β de dos o más proteínas parcialmente plegadas se asocian para empezar a formar la fibrilla amiloide. La fibrilla crece en el medio extracelular. Otras partes de la proteína se pliegan entonces de modo diferente y se mantienen en el exterior del núcleo de hoja β de la fibrilla en crecimiento. En la Fig. 4-32c se muestra el efecto estabilizante de la estructura de los residuos aromáticos. La aparición de los síntomas de las amiloidosis suele ser muy lenta a causa de que la mayor parte de las moléculas de proteína se pliegan con normalidad. Los síntomas pueden aparecer a edades más tempranas si una persona hereda una mutación, como por ejemplo la sustitución con un aminoácido aromático en una posición que favorece la formación de fibras amiloides.

En eucariotas, las proteínas destinadas a la secreción se pliegan inicialmente en el retículo endoplasmático (RE; consulte la ruta en el Capítulo 27). Cuando aparecen situaciones de estrés o cuando la síntesis de proteínas amenaza con colapsar la capacidad de plegamiento de proteínas del RE, pueden acumularse proteínas no plegadas. Esta situación activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR según sus siglas en inglés). El conjunto de reguladores transcripcionales que constituyen la UPR coordinan los diversos sistemas, incrementando las concentraciones de chaperonas en el RE o haciendo descender la tasa de síntesis de proteínas, o las dos cosas a la vez. Los agregados amiloides formados antes de la intervención de la UPR pueden ser eliminados. Algunos de ellos son degradados por **autofagia**. En este proceso

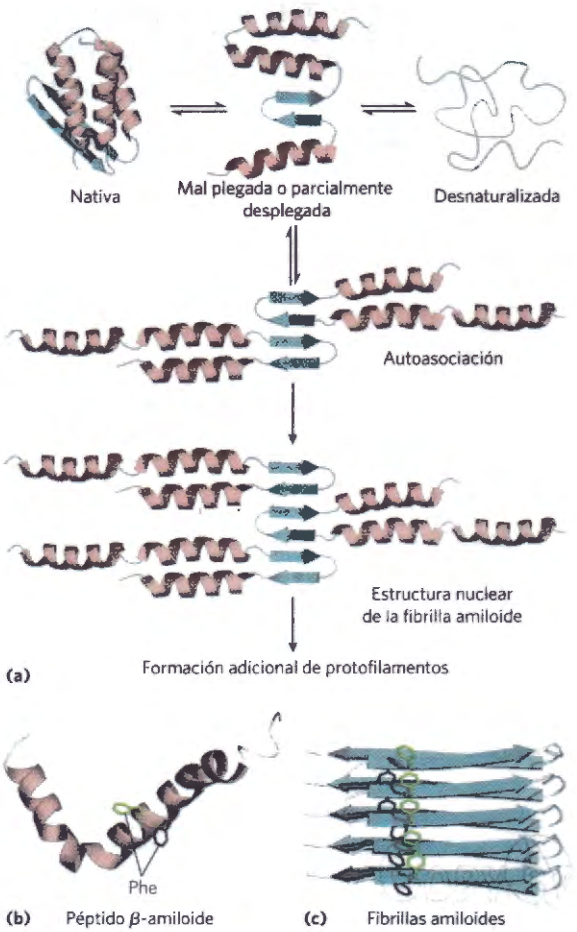


FIGURA 4-32 Formación de fibrillas amiloides patogénicas. (a) Las moléculas de proteína en cuya estructura normal hay regiones de estructura β se pliegan parcialmente. Antes de que se complete el plegamiento, en un pequeño número de moléculas las regiones en hoja β de un polipéptido se asocian con la misma región de otro polipéptido formando el núcleo de un amiloide. Moléculas de proteína adicionales se asocian lentamente con el amiloide y lo extienden para formar una fibrilla. **(b)** El péptido β-amiloide es originalmente un segmento de dos hélices α de una proteína mayor. La rotura proteolítica de esta proteína libera un péptido β-amiloide relativamente inestable que pierde su estructura en hélice α. Este péptido puede a continuación empezar a formar lentamente fibrillas amiloides **(c)** que contribuyen a generar las placas características en el exterior del tejido nervioso de las personas con la enfermedad de Alzheimer. Las cadenas laterales aromáticas aquí mostradas tienen un importante papel en la estabilización de la estructura amiloide. El amiloide es rico en estructura en hoja β, con las cadenas β dirigidas perpendicularmente al eje de la fibrilla de amiloide. El péptido β-amiloide adopta una estructura en forma de hoja β paralela y extendida de dos capas. Algunos péptidos formadores de amiloide pueden plegarse para formar hélices β levógiras. [Fuentes: (a) Información de D.J. Selkoe, *Nature*, 426:900, 2003, Fig. 1. (b) ODB ID 1IYT, O. Creszenci et al., *Eur. J. Biochem.* 269:5642, 2002. (c) PDB ID 2BEG, T. Lührs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102:17,342, 2005.]

son encapsulados en primer lugar por una membrana y a continuación el contenido de la vesícula resultante se degrada después de su fijación a un lisosoma citosólico. De manera alternativa, las proteínas plegadas de forma incorrecta pueden ser degradadas por un sistema de proteasas llamado sistema ubiquitina-proteasoma (descrito en el Capítulo 27). Defectos en cualquiera de estos sistemas disminuyen la capacidad de tratar el problema de las proteínas mal plegadas e incrementan la tendencia al desarrollo de enfermedades relacionadas con amiloides. La UPR es una respuesta compleja, que implica muchos factores y señales proteicas, y la inactivación de los componentes de la UPR puede tener efectos positivos o negativos en el grado de desplegamiento de las proteínas. Este sistema es una atractiva diana farmacológica en relación con las enfermedades de mal plegamiento de proteínas (enfermedades amiloides).

Algunas amiloidosis son sistémicas y afectan a muchos tejidos. La amiloidosis sistémica primaria es causada por la deposición de fibrillas consistentes en cadenas ligeras de inmunoglobulinas (descritas en el Capítulo 5) mal plegadas o en fragmentos de cadenas ligeras derivadas de roturas proteolíticas. Los síntomas aparecen por término medio a los 65 años. Los pacientes tienen síntomas que incluyen fatiga, ronquera, hinchazón y pérdida de peso, y muchos mueren dentro del primer año a partir del diagnóstico. Los órganos más afectados suelen ser el riñón y el corazón. Algunas amiloidosis se asocian con otras enfermedades. Las personas afectadas de ciertas enfermedades crónicas o de tipo inflamatorio tales como artritis reumatoide, tuberculosis, fibrosis cística y algunos tipos de cáncer, pueden experimentar una incremento agudo en la secreción de un polipéptido tendente a la agregación amiloide llamado proteína amiloide sérica (SAA, por serum amyloid protein). Esta proteína, o fragmentos de la misma, se depositan en el tejido conjuntivo del bazo, riñón e hígado y alrededor del corazón. Las personas que sufren esta enfermedad, conocida como amiloidosis sistémica secundaria, presentan una amplia gama de síntomas, en función de los órganos afectados inicialmente. El resultado suele ser fatal en pocos años. Se han asociado más de 80 amiloidosis con mutaciones en la transtirretina, (una proteína que se une a hormonas tiroideas, las transporta y las distribuye a través del cuerpo y en el cerebro). Diferentes mutaciones de esta proteína dan lugar a deposición amiloide concentrada en diferentes tejidos, generando síntomas diferentes. También se han asociado amiloidosis con mutaciones heredadas en las proteínas lisozima, cadena α del fibrinógeno A y las apolipoproteínas A-I y A-II; todas ellas se describirán en capítulos posteriores.

Algunas enfermedades amiloides se asocian con órganos concretos. En estos casos, la proteína tendente a la formación de amiloides se secreta únicamente en el tejido afectado y su concentración local elevada da lugar a la deposición amiloide alrededor de este tejido (aunque una parte de la proteína puede tener una distribución sistémica). Un lugar habitual de deposición amiloide es cerca de las células β pancreáticas, responsables de la secreción de insulina y de la regulación del metabolismo de la glucosa (véase la Fig. 23-27). La secreción por parte de las células β de una pequeño péptido (de 37 aminoácidos) llamado polipéptido amiloide de islotes (IAPP) o amilina, puede producir la formación de depósitos amiloides alrededor de los islotes, destruyendo gradualmente las células. Una adulto sano tiene entre 1 millón y millón y medio de células pancreáticas β. Con su pérdida progresiva, la homeostasis de glucosa queda afectada y finalmente, cuando la pérdida celular llega al 50% o más, la enfermedad se transforma en una diabetes mellitus del tipo 2 (no dependiente de insulina).

RECUADRO 4-6 MEDICINA Muerte por plegamiento incorrecto: las enfermedades priónicas

El agente causal de varias enfermedades degenerativas raras del cerebro de mamíferos parece ser un plegamiento incorrecto de una proteína. Quizá la que mejor se conoce de éstas es la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, también denominada enfermedad de las vacas locas). Entre las enfermedades relacionadas se cuentan el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos, el "scrapie" en ovejas y la enfermedad de consunción crónica de ciervos y alces. Estas enfermedades también se conocen como encefalopatías espongiformes, denominadas así a causa de la frecuencia con que el cerebro enfermo está lleno de agujeros (Fig. 1). El deterioro progresivo del cerebro da lugar a un espectro de síntomas neurológicos que incluyen pérdida de peso, comportamiento errático, problemas posturales, de equilibrio y coordinación y pérdida de función cognitiva. Estas enfermedades son mortales.

En los años 1960, se observó la ausencia de ácidos nucleicos en las preparaciones de los agentes causantes de la enfermedad. Por aquel tiempo, Tikvah Alper sugirió que el agente era una proteína. Inicialmente, la idea pareció una herejía. Todos los agentes causantes de enfermedades conocidas hasta el momento (virus, bacterias, hongos, etc.) contenían ácidos nucleicos y su virulencia estaba relacionada con la reproducción genética y la propagación. Sin embargo, cuatro décadas de investigaciones, notablemente a cargo de Stanley Prusiner, han aportado pruebas de que las encefalopatías espongiformes son diferentes.

Se ha identificado el agente infeccioso como una única proteína (M_r 28.000), a la cual Prusiner apodó proteína **prión** (PrP). El nombre deriva de *prot*einaceous *in*fectious, pero Prusiner creyó que "prión" sonaba mejor que "proin". La proteína prión o priónica es un constituyente normal del tejido cerebral de todos los mamíferos. No se conoce con detalle su función, aunque podría tratarse de una proteína señalizadora. Los linajes de ratones a los que les falta el gen de PrP (y por consiguiente la propia proteína) parecen no sufrir los efectos de ninguna enfermedad. La enfermedad aparece sólo cuando la PrP celular normal o PrP^C se pliega en una conformación alterada denominada

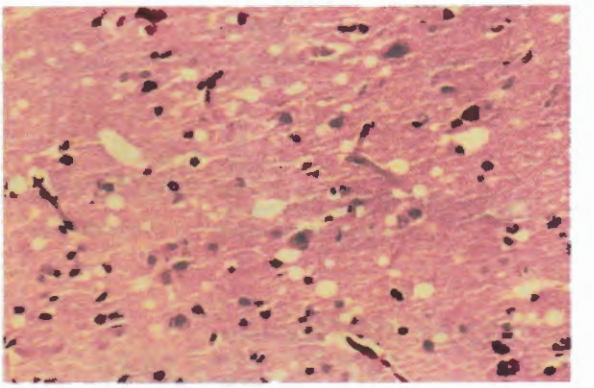


FIGURA 1 Sección teñida del córtex cerebral de un paciente con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob donde se muestra la degeneración espongiforme (vacuolar), la propiedad neurohistológica más característica. Las vacuolas amarillentas son intracelulares y se dan mayoritariamente en los procesos pre- y postsinápticos de las neuronas. En esta sección las vacuolas tienen de 20 a 100 *mm* de diámetro. [Fuente: Ralph C. Eagle, Jr./Science Source.]

Las enfermedades de deposición amiloide que provocan neurodegeneración, en especial en adultos de edad avanzada, son un caso especial de amiloidosis localizadas. La enfermedad de Alzheimer está asociada con la deposición amiloide extracelular por las neuronas del péptido β-amiloide (Figura 4.32b), derivado de una proteína transmembrana mayor (la proteína precursora de β-amiloide) presente en la mayor parte de tejidos humanos. Cuando forma parte de la proteína de mayor tamaño, el péptido está compuesto por dos segmentos α-helicoidales que abarcan la membrana y cuando proteasas específicas cortan los dominios interno y externo, el péptido β-amiloide, relativamente inestable, abandona la membrana y pierde su estructura α-helicoidal. Puede adoptar entonces la forma de dos láminas de hoja β paralela extendida, que puede formar lentamente fibrillas amiloides (Fig. 4-32c). Parece ser que estos depósitos de fibrillas amiloides son la causa primaria de la enfermedad de Alzheimer, pero un segundo tipo de agregación de tipo amiloide en la que interviene una proteína denominada tau ocurre también en el interior de las neuronas de pacientes afectados por la enfermedad. Las mutaciones hereditarias en la proteína tau no conducen al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer pero provocan demencia frontotemporal y parkinsonismo (una enfermedad con síntomas parecidos a los de la enfermedad de Parkinson) que pueden resultar igual de devastadores.

Otras enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con la agregación intracelular de proteínas mal plegadas. En la enfermedad de Parkinson, la forma mal plegada de la proteína α-sinucleína se agrega formando masas filamentosas esféricas denominadas cuerpos de Lewy. En la enfermedad de Huntington aparece la proteína huntingtina, que tiene una larga repetición de poliglutamina. En algunos individuos la repetición de poliglutamina es más larga de lo normal y ello da lugar a una forma más sutil de agregación intracelular. Es interesante observar que cuando las proteínas mutantes humanas implicadas en las enfermedades de Parkinson i Huntington se expresan en *Drosophila melanogaster*, las moscas muestran neurodegeneración que se expresa en forma de deterioración ocular, temblores y muerte temprana. Todos estos síntomas se suprimen en gran parte si se incrementa la expresión de la chaperona Hsp70.

El plegamiento erróneo de proteínas no necesita generar la formación de amiloides para ser patogénica.

PrP^{sc} (Sc indica "scrapie"). La estructura de PrP^{c} contiene dos hélices α. La de PrP^{Sc} es muy diferente, con gran parte de la estructura convertida en hojas β de tipo amiloide (Fig. 2). La interacción de PrP^{sc} con PrP^{c} convierte a esta última en PrP^{sc}, iniciándose un efecto dominó, por el que más y más proteína cerebral se convierte en la forma causante de la enfermedad. No se conoce el mecanismo por el que la presencia de PrP^{sc} conduce a la encefalopatía espongiforme.

En las formas hereditarias de las enfermedades priónicas, una mutación en el gen que codifica PrP origina un cambio en un residuo aminoácido del que se cree que hace más probable la conversión de PrP^{c} en PrP^{sc}. La comprensión completa de las enfermedades priónicas necesita nueva información acerca de cómo la proteína prión afecta la función cerebral. La información estructural sobre la PrP está empezando a desvelar el proceso molecular que permite que las proteínas priónicas interaccionen para alterar su conformación (Fig. 2). La importancia de los priones puede extenderse más allá de las encefalopatías espongiformes. Aumentan las pruebas de que proteínas priónicas pueden ser responsables de otras enfermedades neurodegenerativas adicionales, como la atrofia sistémica múltiple (ASM), parecida en sus síntomas a la enfermedad de Parkinson.

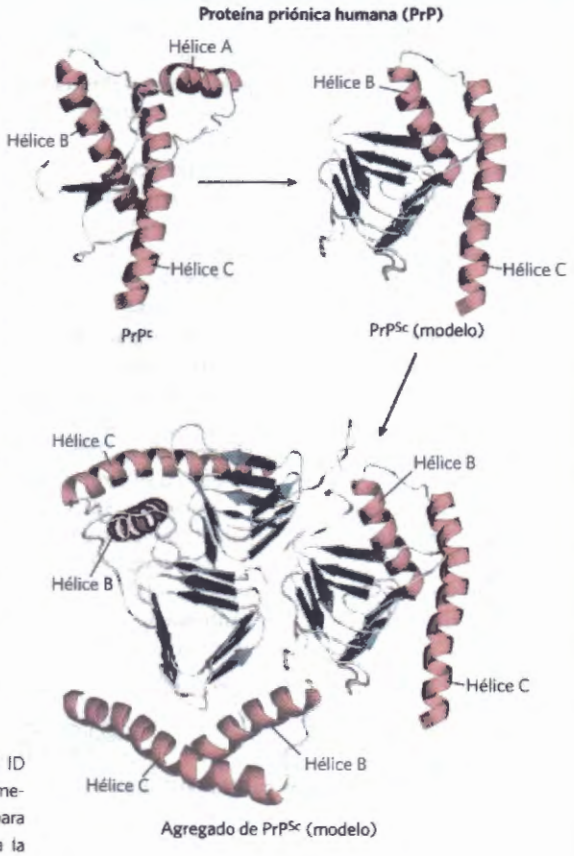


FIGURA 2 Estructura del dominio globular de la PrP humana (PDB ID 1QLX) y modelos de la conformación mal plegada y causante de enfermedad de PrP^{sc} y un agregado de PrP^{sc}. Las hélices α están etiquetadas para ayudar a seguir el cambio conformacional. La hélice A se incorpora a la estructura en hoja β de la conformación mal plegada. [Fuentes: PrP humana de PDB ID 1QLX, R. Zahn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:145, 2000. Modelos de C. Govaerts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8342, 2004.]

Por ejemplo, la fibrosis cística está causada por defectos en una proteína unida a membrana denominada regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística (CFTR en sus siglas en inglés), que actúa como un canal para el paso de los iones cloruro. La mutación más común entre las que causan la fibrosis cística es una supresión de un residuo Phe en la posición 508 de CFTR, que provoca el mal plegamiento de la proteína. Como consecuencia de ello la mayor parte de la proteína se degrada, perdiéndose su función (véase el Recuadro 11-2). Muchas de las mutaciones relacionadas con las enfermedades del colágeno provocan también un plegamiento defectuoso. Un tipo especialmente destacable de plegamiento incorrecto de proteínas es el de las enfermedades priónicas (Recuadro 4-6). ■

RESUMEN 4.4 Desnaturalización y plegamiento de proteínas

- El mantenimiento en estado estacionario de las proteínas celulares activas requeridas en unas condiciones específicas, denominado proteostasis, implica un conjunto de rutas y procesos que pliegan, repliegan y degradan cadenas polipeptídicas.
- La estructura tridimensional y la función de la mayoría de proteínas puede destruirse por desnaturalización, lo que demuestra la relación entre estructura y función. Algunas proteínas desnaturalizadas pueden renaturalizarse espontáneamente para formar proteínas biológicamente activas, lo que demuestra que la estructura terciaria de las proteínas está determinada por la secuencia de aminoácidos
- El plegamiento de las proteínas en el interior de la célula es, generalmente, jerárquico. En un principio pueden formarse regiones de estructura secundaria, seguidos por el plegamiento en motivos y dominios. Grandes formaciones de intermediarios de plegamiento evolucionan rápidamente hacia una única conformación nativa.
- Muchas proteínas reciben la asistencia de chaperonas Hsp70 y de chaperoninas en su plegamiento. Enzimas específicos catalizan la formación de enlaces disulfuro y la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos con Pro.
- El plegamiento defectuoso de proteínas es la base molecular de una amplia gama de enfermedades humanas que incluyen las amiloidosis.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

conformación 116
conformación nativa 116
efecto hidrofóbico 116
capa de solvatación 116
grupo peptídico 118
representación de Ramachandran 119
estructura secundaria 120
hélice α 121
conformación β 123
hoja β 123
giro β 123
espectroscopia de dicroísmo circular (CD) 125
estructura terciaria 125
estructura cuaternaria 125
proteínas fibrosas 125
proteínas globulares 125
α-queratina 126
colágeno 130
fibroína de la seda 131
***Protein Data Bank* (PDB)** 132
motivo 137
plegamiento 137
dominio 137
proteínas intrínsecamente desordenadas 139
diagrama topológico 141
familia de proteínas 141
multímero 141
oligómero 141
protómero 141
proteostasis 142
desnaturalización 143
renaturalización 144
chaperona 146
Hsp70 146
chaperonina 146
proteína disulfuro isomerasa (PDI) 147
péptido prolil cis-trans isomerasa (PPI) 147
amiloide 147
amiloidosis 147
autofagia 148
prión 150

Problemas

1. Propiedades del enlace peptídico En los estudios por rayos X con péptidos cristalinos, Linus Pauling y Robert Corey encontraron que el enlace C—N del enlace peptídico tiene una longitud intermedia (1,32 Å) entre un enlace sencillo C—N típico (1,49 Å) y un doble enlace C=N (1,27 Å). También observaron que el enlace peptídico es plano (los cuatro átomos unidos al grupo C—N se encuentran localizados en el mismo plano) y que los dos carbonos α unidos al C—N se encuentran siempre en posición trans (en lados opuestos del enlace peptídico):

(a) ¿Qué es lo que indica la longitud del enlace C—N sobre su fortaleza y su orden de enlace, es decir, acerca de si es un enlace sencillo, doble o triple?

(b) ¿Qué nos dicen las observaciones de Pauling y Corey acerca de la facilidad de rotación alrededor del enlace peptídico C—N?

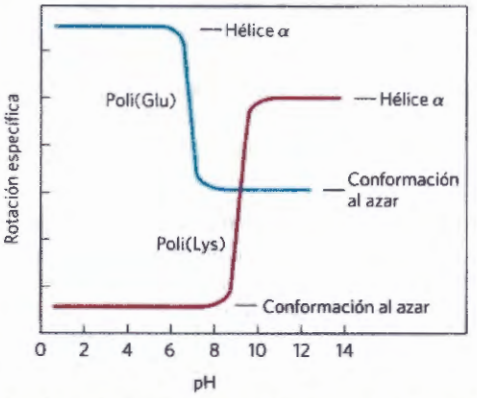
2. Relaciones estructurales y funcionales en las proteínas fibrosas William Astbury descubrió que el patrón de difracción de rayos X de la lana indica la presencia de unidades estructurales repetitivas separadas por una distancia de 5,2 Å en la dirección de la fibra de lana. Cuando se sometía la lana a la acción del vapor y a estiramiento, el patrón de rayos X mostraba una nueva unidad estructural repetitiva cada 7,0 Å. Si después de someter la lana a la acción del vapor y estirarla se la dejaba encoger de nuevo, el patrón obtenido se correspondía con el original, con una separación de aproximadamente 5,2 Å. A pesar de que estas observaciones proporcionaron claves importantes acerca de la estructura molecular de la lana, Astbury no fue capaz de interpretarlas en aquel momento.

(a) Interprete las observaciones de Astbury a la luz de nuestros conocimientos actuales sobre la estructura de la lana.

(b) Cuando se lavan suéteres o calcetines de lana en agua caliente o se calientan en una secadora, se encogen. Por otro lado, y en las mismas condiciones, la seda no encoge. Explíquelo.

3. Velocidad de síntesis de la α-queratina del cabello El cabello crece a una velocidad de 15 o 20 cm/año. Todo este crecimiento se concentra en la base de la fibra de cabello, donde los filamentos de α-queratina se sintetizan en el interior de las células epidérmicas vivas, para unirse posteriormente y formar estructuras en forma de soga (véase la Fig. 4-11). El elemento estructural fundamental de la α-queratina es la hélice α que tiene 3,6 residuos aminoácidos por vuelta y un desplazamiento de 5,4 Å por vuelta (véase la Fig. 4-4a). Considerando que la biosíntesis de las cadenas α-helicoidales de la queratina es el factor limitante de velocidad en el crecimiento del cabello, calcule la velocidad a la que deben formarse los enlaces peptídicos (enlaces peptídicos por segundo), para justificar el crecimiento anual observado.

4. Efecto del pH sobre la conformación de las estructuras secundarias α-helicoidales El desplegamiento de la hélice α de un polipéptido para dar lugar a una conformación desordenada viene acompañado por un gran descenso de una propiedad que se denomina rotación específica, una medida de la capacidad de una disolución para hacer girar el plano de la luz polarizada. El poliglutamato, un polipéptido formado únicamente por residuos de L-Glu, tiene una conformación α-helicoidal a pH 3. Al aumentar el pH a 7 se observa un gran descenso en la rotación específica de la disolución. De manera similar, la polilisina (residuos de L-Lys) es una hélice α a pH 10, pero su rotación específica también desciende al cambiar a pH 7, tal como se muestra en el gráfico siguiente.



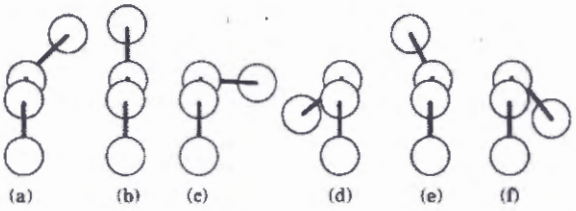
¿Cuál es la explicación del efecto de los cambios de pH sobre las conformaciones de poli(Glu) y poli(Lys)? ¿Por qué se produce la transición en un margen tan estrecho de pH?

5. Los enlaces disulfuro determinan las propiedades de muchas proteínas Algunas proteínas naturales son muy ricas en enlaces disulfuro, y sus propiedades mecánicas (resistencia a la tensión, viscosidad, dureza, etc.) se correlacionan con el grado de formación de enlaces disulfuro.

(a) La glutenina, una proteína del trigo rica en enlaces disulfuro, es la responsable del carácter cohesivo y elástico de la masa elaborada con harina de trigo. De manera similar, la dureza y resistencia de los caparazones de tortuga es debida a la exhaustiva presencia de enlaces disulfuro en su α-queratina. ¿Cuál es la base molecular de la correlación existente entre contenido en enlaces disulfuro y propiedades mecánicas de la proteína?

(b) La mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan y pierden su actividad cuando se calientan brevemente a 65 °C. Sin embargo, a menudo se observa que las proteínas globulares que contienen muchos enlaces disulfuro deben ser calentadas durante más tiempo y a mayor temperatura para desnaturalizarlas. Una de estas proteínas es el inhibidor pancreático bovino de la tripsina (BPTI), que tiene 58 residuos aminoácidos en una sola cadena y contiene tres enlaces disulfuro. Al enfriar una disolución de BPTI desnaturalizado, se recupera la actividad de la proteína. ¿Cuál es la base molecular de esta propiedad?

6. Ángulos diedros En la figura se muestra una serie de valores de los ángulos de torsión ϕ y ψ que pueden ser adoptados por una cadena polipeptídica. ¿Cuál de ellos se corresponde más exactamente con el adoptado por una triple hélice ideal del colágeno? Consulte la Figura 4-9 como referencia.



7. Secuencia de aminoácidos y estructura proteica La cada vez mayor comprensión de cómo se pliegan las proteínas ha permitido establecer predicciones acerca de la estructura proteica basándose en los datos de la secuencia primaria de aminoácidos. Considere la siguiente secuencia de aminoácidos.

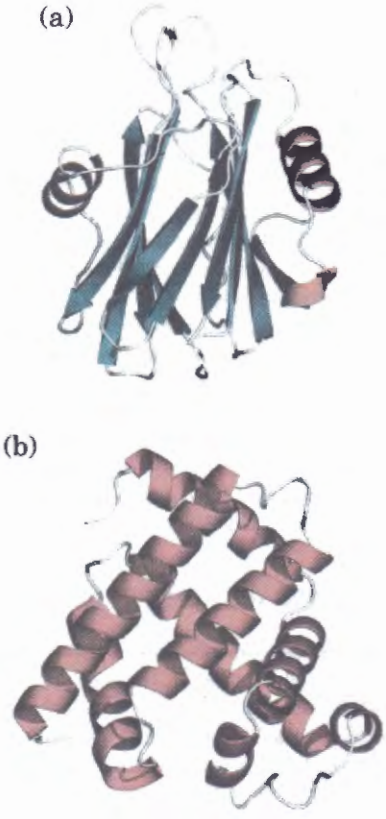
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ile–	Ala–	His–	Thr–	Tyr–	Gly–	Pro–	Phe–	Glu–	Ala–
11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
Ala–	Met–	Cys–	Lys–	Trp–	Glu–	Ala–	Gln–	Pro–	Asp–
21	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**		
Gly–	Met–	Glu–	Cys–	Ala–	Phe–	His–	Arg		

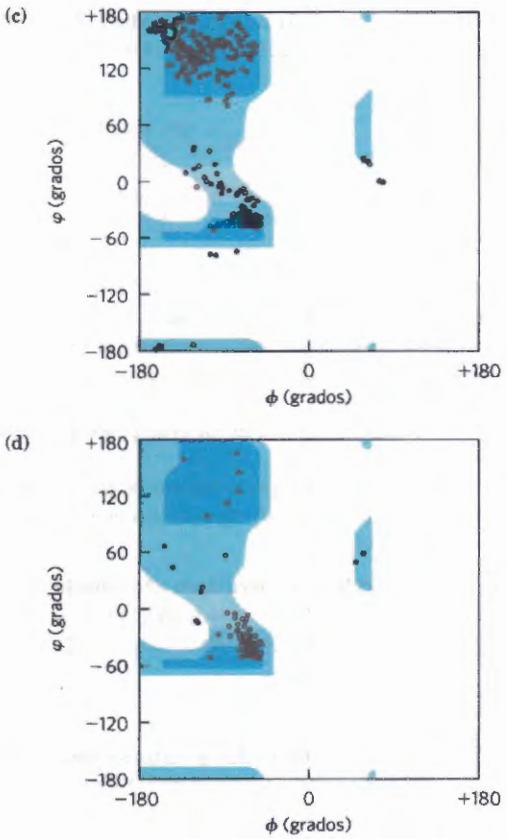
(a) ¿Dónde podría haber giros β?

(b) ¿En qué posiciones se podrían formar enlaces disulfuro intracatenarios?

(c) Teniendo en cuenta que esta secuencia es parte de una proteína globular más grande, indique la posible localización, ya sea en el interior de la proteína o en su superficie externa, de los siguientes residuos aminoácidos: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique su razonamiento. (Pista: vea el índice de hidropatía en la Tabla 3-1).

8. La bacteriorrodopsina en las proteínas púrpura de membrana En condiciones ambientales apropiadas, la arquea halófila denominada *Halobacterium halobium* sintetiza una proteína de membrana (M_r 26.000) conocida como bacteriorrodopsina, que es de color púrpura porque contiene retinal (véase la Fig. 10-20). Las moléculas de esta proteína se agregan formando "manchas púrpura" en la membrana celular. La bacteriorrodopsina actúa como una bomba de protones activada por la luz que proporciona energía para las funciones celulares. El análisis de esta proteína por rayos X indica que está formada por siete segmentos de hélice α paralelos, cada uno de los cuales atraviesa la membrana de la célula bacteriana (de un grosor de 45 Å). Calcule el número mínimo de residuos aminoácidos necesario para que un segmento de hélice α atraviese completamente la membrana. Calcule cuál es la fracción de la proteína bacterio-





rrodopsina que está implicada en las hélices que abarcan la membrana (Utilice una masa media por residuo aminoácido de 110).

9. Terminología de estructura de proteínas. La mioglobina, ¿es un motivo, un dominio o una estructura tridimensional completa?

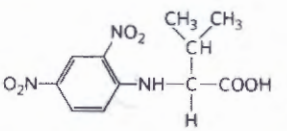
10. Interpretación de los diagramas de Ramachandran Examine las dos proteínas marcadas debajo como (a) y (b). ¿Cuál de los dos diagramas de Ramachandran, marcados (c) y (d) corresponde con mayor probabilidad a cada proteína? ¿Por qué? [Fuentes: (a) PDB ID 1GWY, J.M. Mancheno et al., *Structure* 11:1319, 2003. (b) PDB ID 1A6M, J. Vojtechovsky et al., *Biophys. J.* 77:2153, 1999.]

11. Efecto patogénico de la bacteria que provoca la gangrena gaseosa La bacteria anaeróbica *Clostridium perfringens* es muy patogénica siendo responsable de la gangrena gaseosa, una enfermedad que destruye la estructura del tejido animal. Esta bacteria secreta un enzima que cataliza con eficiencia la hidrólisis del enlace peptídico indicado en rojo en la secuencia:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow{H_2O} \text{—X—COO}^- + H_3\overset{+}{N}\text{—Gly—Pro—Y—}$$

donde X e Y son cualquiera de los 20 aminoácidos estándar. ¿De qué modo contribuye la secreción de este enzima a la invasividad de esta bacteria en los tejidos humanos? ¿Por qué este enzima no afecta a la propia bacteria?

12. Número de cadenas polipeptídicas en una proteína múltiples subunidades. Una muestra (660 mg) de una proteína oligomérica de M_r 132.000 se trató con un exceso de 1-fluor-2,4-dinitrobenceno (reactivo de Sanger) en condiciones ligeramente alcalinas hasta que se completó la reacción química. A continuación se hidrolizaron completamente los enlaces peptídicos de la proteína por ebullición en HCl concentrado. Se encontró que el hidrolizado contenía 5,5 mg del compuesto siguiente:



No se encontraron derivados 2,4-dinitrofenílicos de los grupos α-amino de otros aminoácidos.

(a) Explique de qué modo puede usarse esta información para determinar el número de cadenas polipeptídicas en una proteína oligomérica.

(b) Calcule el número de cadenas polipeptídicas en esta proteína.

(c) ¿Qué otra técnica de análisis se puede utilizar para determinar si las cadenas polipeptídicas en esta proteína son iguales o diferentes?

13. Predicción de estructura secundaria ¿En cuál de los siguientes péptidos es más probable que se observe un plegamiento en hélice α y por qué?

(a) LKAENDEAARAMSEA
(b) CRAGGFPWDQPGTSN

14. Fibras amiloides y enfermedad Se ha observado que varias moléculas aromáticas pequeñas, tales como el rojo de fenol (usado como modelo farmacológico no tóxico), inhiben la formación de amiloides en sistemas modelo de laboratorio. Estos compuestos aromáticos pequeños se investigan con el objetivo de encontrar un medicamento que pueda inhibir eficientemente la formación de amiloides en el cerebro de personas con enfermedad de Alzheimer incipiente.

(a) Sugiera una razón por la que las moléculas con sustituyentes aromáticos podrían impedir la formación de amiloides

(b) Algunos investigadores han sugerido que un fármaco que se usa en el tratamiento del Alzheimer también podría ser efectivo en el tratamiento de la diabetes mellitus del tipo 2 (no dependiente de insulina). ¿Cuál podría ser la razón de que un mismo fármaco pudiera ser efectivo en el tratamiento de estas dos enfermedades distintas?

Bioquímica en la red

15. Modelado de proteínas en Internet. En un intento de identificar el agente causante de la enfermedad de Crohn (una inflamación del intestino), se practicaron biopsias de mucosa intestinal a un grupo de pacientes. Se identificó una proteína que se expresaba a niveles más elevados en los pacientes con enfermedad de Crohn que en pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino no relacionadas o en controles no afectados. Se purificó la proteína y se obtuvo la siguiente secuencia *parcial* de aminoácidos (léase de izquierda a derecha):

EAELCPDRCI	HSFQNLGIQC	VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP	FQVPIEEQRG	DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG	RPLRLPPVLP	HPIFDNRAPN
TAELKICRVN	RNSGSCLGGD	EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG	PGWEARGSFS	QADVHRQVAI
VFRTPPYADP	SLQAPVRVSM	QLRRPSDREL
SEPMEFQYLP	DTDDRHRIEE	KRKRTYETFK
SIMKKSPFSG	PTDPRPPPRR	IAVPSRSSAS
VPKPAPQPYP		

(a) Puede identificar esta proteína utilizando una base de datos como UniProt (www.uniprot.org). En la página principal, acceda al enlace que conduce a una búsqueda BLAST. En la página de BLAST, introduzca unos 30 residuos de la secuencia de la proteína en el campo de búsqueda adecuado y envíelo para su análisis. ¿Qué información le proporciona este análisis acerca de la identidad de la proteína?

(b) Repita el procedimiento utilizando diferentes partes de la secuencia de aminoácidos de la proteína. ¿Obtiene siempre el mismo resultado?

(c) Diversas webs proporcionan información sobre la estructura tridimensional de las proteínas. Encuentre información acerca de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, utilizando bases de datos tales como el *Protein Data Bank* (PDB) o *Structural Classification of Proteins* (SCOP2; http://scop2.mrc-lmb.ca.ac.uk).

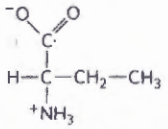
(d) Durante sus búsquedas en la Web trate de encontrar información acerca de la función celular de la proteína.

Problema de análisis de datos

16. Proteínas como imágenes especulares Tal como se comentó en el Capítulo 3, "Los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente estereoisómeros L." No está claro si esta selectividad es necesaria para el funcionamiento correcto de las proteínas o es un accidente evolutivo. Para estudiar esta cuestión, Milton y colaboradores (1992) publicaron

un artículo sobre un enzima hecho enteramente de estereoisómeros de la serie D. Escogieron como enzima la proteasa del VIH, un enzima proteolítico producido por el VIH que convierte las pre-proteínas víricas inactivas en sus formas activas.

Anteriormente, Wlodawer y colaboradores (1989) habían publicado la síntesis química completa de la proteasa del VIH a partir de L-aminoácidos (el L-enzima), utilizando la metodología descrita en la Figura 3-32. La proteasa normal del VIH contiene 2 residuos Cys en las posiciones 67 y 95. Dado que la síntesis química de proteínas con Cys es técnicamente difícil, Wlodawer y sus colaboradores sustituyeron los dos residuos Cys de la proteína por el aminoácido sintético ácido L-α-amino-*n*-butírico (Aba). En palabras de los autores, esto se hizo para "reducir las dificultades sintéticas relacionadas con la desprotección de las Cys y para facilitar la manipulación del producto."



Ácido L-α-amino-*n*-butírico

(a) A continuación se muestra la estructura de Aba. ¿Cuál es la razón de que esta molécula fuera un buen sustituto de un residuo Cys? ¿Bajo qué circunstancias no lo sería?

Wlodawer y colaboradores desnaturalizaron la proteína sintetizada disolviéndola en cloruro de guanidinio HCl 6 M, y a continuación la dejaron plegar lentamente mediante eliminación del cloruro de guanidinio por diálisis frente a un tampón neutro (glicerol 10%, $NaPO_4$ 25 mM, pH 7).

(b) Hay muchas razones que permiten predecir que una proteína sintetizada, desnaturalizada y plegada de este modo no será activa. Dé tres de ellas.

(c) Curiosamente, la L-proteasa resultante era activa. ¿Qué le dice este resultado acerca del papel de los enlaces disulfuro en la proteasa nativa del VIH?

En su nuevo estudio, Milton y colaboradores sintetizaron la proteasa del VIH a partir de D-aminoácidos, utilizando el mismo protocolo que en el estudios anterior (Wlodawer et al.). Formalmente, existen tres posibilidades para el plegamiento de la D-proteasa: podría dar lugar a (1) la misma estructura que la L-proteasa; (2) la imagen especular de la L-proteasa; o (3) alguna otra cosa, probablemente inactiva.

(d) Decida y defienda una respuesta para cada una de las posibilidades.

De hecho, la D-proteasa era activa: hidrolizaba un sustrato sintético y era inhibida por inhibidores específicos. Para examinar la estructura de los enzimas D- y L-, Milton y colaboradores ensayaron la actividad de las dos formas con las formas D y L de un sustrato peptídico quiral y también ensayaron su inhibición con las formas D y L de un análogo peptídico quiral que actuaba como inhibidor. También se ensayó la inhibición de las dos formas a cargo del inhibidor no quiral azul Evans. En la tabla se expresan los resultados de los experimentos.

	Hidrólisis de sustrato		Inhibición		
			Inhibidor peptídico		azul
Proteasa del VIH	D-sustrato	L-sustrato	D-inhibidor	L-inhibidor	Evans (aquiral)
L- proteasa	–	+	–	+	+
D-proteasa	+	–	+	–	+

(e) ¿Cuál de los tres modelos propuestos es respaldado por estos datos? Explique su razonamiento.

(f) El compuesto azul Evans inhibe las dos formas de la proteasa ¿Por qué?

(g) ¿Esperaría que la quimotripsina digiriera la D-proteasa? Explique su razonamiento.

(h) ¿Esperaría que la síntesis total a partir de D-aminoácidos generara enzima activo para cualquier tipo de enzima? Explique su razonamiento.

Referencias

Milton, R.C., S.C. Milton, and S.B. Kent. 1992. Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* 256:1445–1448.

Wlodawer, A., M. Miller, M. Jaskólski, B.K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I.T. Weber, L.M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, and S.B. Kent. 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245:616–621.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 5

Función de las proteínas

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno 158

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas 174

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares 179

Las proteínas funcionan mediante interacción con otras moléculas. El conocimiento de la estructura tridimensional es un paso importante para poder entender cómo funciona una proteína por lo que la biología estructural moderna incluye a menudo el conocimiento de las interacciones moleculares. Sin embargo, la estructura bidimensional estática que se muestra sobre una página tiene poco que ver con la realidad. Las proteínas son moléculas dinámicas Estas interacciones se ven afectadas por cambios, a veces espectaculares y otras sutiles, de la conformación proteica que pueden desencadenar importantes efectos fisiológicos. En este capítulo y en el próximo estudiaremos cómo interaccionan las proteínas con otras moléculas y cómo se relacionan estas interacciones con la estructura dinámica de las proteínas. Aquí dividimos estas interacciones en dos tipos. En algunas interacciones el resultado es una reacción que altera la configuración o composición química de la molécula con la que interactúa, un caso en el que la proteína actúa como catalizador de una reacción, o **enzima**; los enzimas y sus reacciones se discuten en el Capítulo 6. En otras interacciones, no cambia ni la configuración ni la composición de la molécula interactuante; tales interacciones se discuten en este capítulo.

Puede parecer contradictorio que la interacción de una proteína con otra molécula pueda ser importante si no altera a la molécula asociada. Sin embargo, interacciones efímeras de este tipo son la base de procesos fisiológicos complejos tales como el transporte de oxígeno, la función inmune y la contracción muscular, temas que se tratan aquí. Las proteínas que llevan a cabo estos procesos ilustran los principios fundamentales de la función proteica, algunos de los cuales resultarán familiares del Capítulo 4:

Las funciones de muchas proteínas implican la unión reversible de otras moléculas. Una molécula unida de manera reversible por una proteína se conoce con el nombre de **ligando**. Un ligando puede ser cualquier tipo de molécula, incluidas otras proteínas. La naturaleza transitoria de las interacciones proteína-ligando es crítica para la vida, ya que permiten al organismo responder de manera rápida y reversible al medio ambiente cambiante y a las circunstancias metabólicas.

Un ligando se une a un lugar de la proteína llamado **sitio de fijación**, que es complementario al ligando en tamaño, forma, carga y carácter hidrofóbico o hidrofílico. Además, la interacción es específica: la proteína puede discriminar entre las miles de moléculas diferentes de su entorno y unir selectivamente sólo una o unas pocas. Una proteína determinada puede tener diferentes sitios de fijación para diferentes ligandos. Estas interacciones moleculares específicas son cruciales para mantener el alto grado de orden de un sistema vivo. (Esta discusión excluye la unión de agua, que puede interaccionar débilmente y de manera no específica con diferentes partes de una proteína. En el Capítulo 6 consideraremos el agua como un ligando específico para muchos enzimas).

Las proteínas son flexibles. Los cambios en su conformación pueden ser sutiles, reflejo de vibraciones moleculares y pequeños movimientos de los residuos de aminoácidos a lo largo de la proteína. De una proteína que se flexiona de este modo se dice a veces que "respira". Los cambios en la conformación pueden ser también muy grandes, con segmentos importantes de la estructura de la proteína desplazándose incluso varios nanómetros. Ciertos cambios específicos de la conformación acostumbran a ser esenciales para la función proteica.

La unión de una proteína con un ligando está asociada, a menudo, con un cambio conformacional que hace que el sitio de fijación sea más complementario al ligando, lo que permite una unión más fuerte. La adaptación estructural que se produce entre la proteína y el ligando se llama **encaje inducido**.

En una proteína con varias subunidades, un cambio de conformación en una subunidad afecta a menudo a la conformación de las otras subunidades.

Las interacciones entre ligandos y proteínas pueden ser reguladas, habitualmente mediante interacciones específicas con uno o más ligandos adicionales. Estos otros ligandos pueden provocar cambios conformacionales que afecten a la unión del primer ligando.

Los enzimas representan un caso especial en la función proteica. Los enzimas unen y transforman químicamente otras moléculas. Las moléculas sobre las que actúan los enzimas se llaman **sustratos** de la reacción, en lugar de ligandos, y el sitio de fijación del ligando se llama **sitio catalítico** o **sitio activo**. Veremos como el tratamiento de los temas de este capítulo (unión, especificidad y cambios de conformación) continúan en el Capítulo 6, con el elemento añadido de que las proteínas actuarán en transformaciones químicas.

5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

La mioglobina y la **hemoglobina** son posiblemente las dos proteínas más estudiadas y mejor conocidas. Fueron las primeras de las que se determinó su estructura tridimensional, y con estas dos moléculas se ilustran casi todos los aspectos de uno de los procesos bioquímicos más importantes: la unión reversible de un ligando a una proteína. Este modelo clásico de la función proteica nos dará una gran cantidad de información sobre como trabajan las proteínas.

El oxígeno puede unirse a un grupo prostético hemo

El oxígeno no es muy soluble en el agua (véase la Tabla 2-3) y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo. La difusión del oxígeno a través de los tejidos es también insuficiente a lo largo de distancias superiores a unos pocos milímetros. La evolución de animales multicelulares grandes dependió de la evolución de proteínas que pudiesen transportar y almacenar oxígeno. Sin embargo, ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos proteicos es adecuada para la unión reversible de moléculas de oxígeno. Este papel es desempeñado por ciertos metales de transición, entre ellos el hierro y el cobre, que tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno. Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales, normalmente del hierro, para el transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro libre provoca la formación de especies altamente reactivas del oxígeno, tales como los radicales hidroxilo, que pueden dañar el DNA u otras macromoléculas. Por lo tanto, el hierro utilizado en las células está presente en formas que lo secuestran, lo hacen menos reactivo o las dos cosas a la vez. En los organismos multicelulares, especialmente en aquéllos en los que el hierro, en su calidad de transportador de oxígeno, debe ser transportado a lo largo de grandes distancias, el hierro suele estar incorporado a un grupo prostético unido a una proteína, llamado grupo **hemo**. (Recuerde que en el Capítulo 3 vimos que un grupo prostético es un compuesto asociado permanentemente a una proteína y que contribuye a su función).

El grupo hemo tiene una estructura de anillo orgánico complejo, la **protoforpirina**, a la que está unido un único átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}) **(Fig. 5-1)**. El átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, cuatro con átomos de nitrógeno que forman parte del sistema plano del **anillo de porfirina** y dos perpendiculares a la porfirina. Los átomos de nitrógeno coordinados (que tienen carácter de dadores de electrones) ayudan a evitar la conversión del hierro hemo al estado férrico (Fe^{3+}). El hierro en estado Fe^{2+} une oxígeno de manera reversible, mientras que en el estado Fe^{3+} no une oxígeno. El grupo hemo se encuentra en muchas proteínas transportadoras de oxígeno, y también en algunas proteínas, como los citocromos, que participan en reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones) (Capítulo 19).

Las moléculas de hemo libres (hemo no unido a proteínas), dejan el Fe^{2+} con dos enlaces de coordinación "abiertos". La reacción simultánea de una molécula de O_2 con dos moléculas de hemo libres (o con dos Fe^{2+} libres)

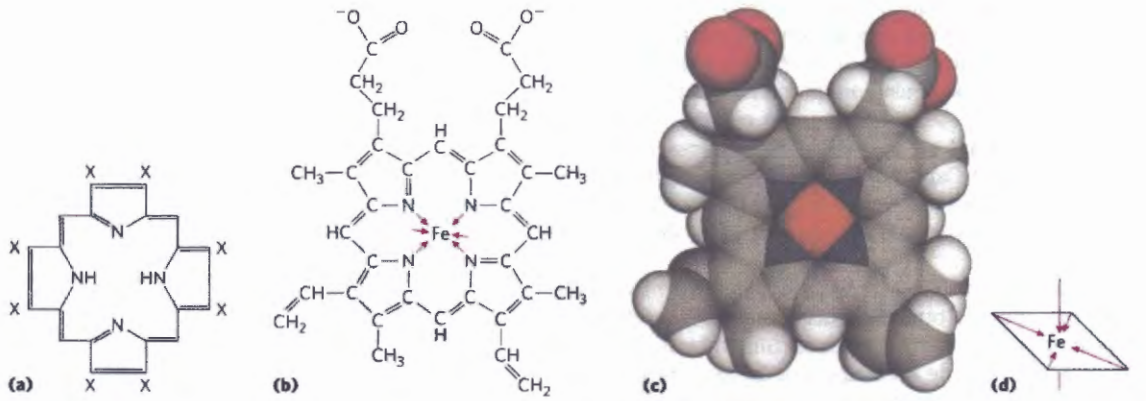


FIGURA 5-1 El grupo hemo. El grupo hemo está presente en la mioglobina, hemoglobina y en muchas otras proteínas llamadas **proteínas hemo** o **hemoproteínas**. El grupo hemo consiste en un anillo orgánico complejo, la protoporfirina IX, al cual se une un átomo de hierro en su estado ferroso (Fe^{2+}). **(a)** Las porfirinas, de las que la protoporfirina IX es sólo un ejemplo, consisten en cuatro anillos pirrol unidos por puentes meteno, con sustituciones en una o más de las posiciones marcadas como X. **(b, c)** Se muestran dos representaciones del grupo hemo. El átomo de hierro del grupo hemo posee seis enlaces de coordinación: cuatro de ellos unidos al anillo plano de la porfirina y en su mismo plano, y **(d)** otros dos perpendiculares a este plano.[Fuente: (c) Hemo extraído de PDB ID 1CCR, H. Ochi et al., *J. Mol. Biol.* 166:407, 1983.]

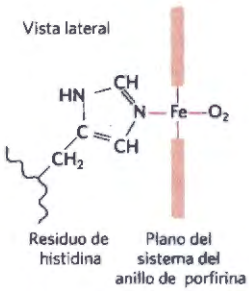


FIGURA 5-2 Vista lateral del grupo hemo. Esta perspectiva muestra los dos enlaces de coordinación del Fe^{2+} perpendiculares al sistema del anillo porfirina. Uno de estos dos enlaces está ocupado por un residuo His, a veces llamada His próxima, His^{93} en la mioglobina, también denominada His F8 (octavo residuo en la hélice α F; véase la Fig. 5-3) ; el otro es el sitio de fijación del oxígeno. Los cuatro enlaces de coordinación restantes están unidos al sistema de anillo porfirínico y se encuentran en el mismo plano.

puede dar lugar a la conversión irreversible del Fe^{2+} a Fe^{3+}. En las proteínas que contienen hemo, esta reacción se evita secuestrando cada hemo en un lugar suficientemente profundo dentro de la estructura proteica. Así, el acceso a los dos enlaces de coordinación abiertos está restringido. En las globinas uno de esos dos enlaces de coordinación está ocupado por el nitrógeno de la cadena lateral de un residuo His muy conservado conocido como **His próxima**. El otro es el sitio de fijación del oxígeno molecular (O_2) **(Fig. 5-2)**. Las propiedades electrónicas del hierro del grupo hemo cambian cuando se une el oxígeno; esto explica el cambio de color de la sangre desde el púrpura oscuro de la sangre venosa sin oxígeno al rojo brillante de la sangre arterial rica en oxígeno. Algunas moléculas pequeñas, como el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO) pueden coordinarse con el hierro del grupo hemo con mayor afinidad que el O_2. Cuando una molécula de CO se une al grupo hemo el O_2 queda excluido, siendo ésta la razón por la que el CO es altamente tóxico para los organismos aeróbicos (como se puede ver en el Recuadro 5-1). Las proteínas de unión a oxígeno regulan el acceso del CO y otras moléculas pequeñas al hierro del grupo hemo mediante el rodeo y secuestro del grupo hemo en su estructura.

Las globinas son una familia de proteínas de unión de oxígeno

Las **globinas** constituyen una familia de proteínas muy extendida en la que todos sus miembros tienen unas estructuras primaria y terciaria similares. Las globinas se encuentran habitualmente en eucariotas de todas las clases e incluso en algunas bacterias. La mayoría funcionan en el transporte o almacenamiento de oxígeno, aunque algunas tienen la función de sensores de oxígeno, óxido nítrico o monóxido de carbono. El gusano nematodo sencillo *Caenorhabditis elegans* tiene genes que codifican 33 globinas diferentes. En los humanos y otros mamíferos, existen como mínimo cuatro clases de globinas. La mioglobina monomérica facilita la difusión de oxígeno en el tejido muscular. La mioglobina es muy abundante en los músculos de los mamíferos marinos buceadores tales como las focas y las ballenas, en las que también tiene una función de almacenamiento de oxígeno para las excursiones submarinas prolongadas. La hemoglobina tetramérica es responsable del transporte de oxígeno en el torrente circulatorio. La neuroglobina monomérica se expresa fundamentalmente en las neuronas y ayuda a proteger el cerebro de la hipoxia (suministro restringido de sangre). La citoglobina, otra globina monomérica, se encuentra en concentraciones elevadas en las paredes de los vasos sanguíneos en donde funciona regulando las concentraciones de óxido nítrico (se discute en los Capítulos 12 y 23).

La mioglobina tiene un único sitio de fijación para el oxígeno

La mioglobina (M_r 16.700; abreviada Mb) es un polipéptido simple de 153 residuos aminoácidos con una molécula de hemo. Como es típico de los polipétidos de las globinas la mioglobina está formada por ocho segmentos de hélice α conectados por giros **(Fig. 5-3)**. Alrededor de un 78% de los residuos aminoácidos presentes en la proteína se encuentran en estas hélices α.

Cualquier discusión detallada sobre la función de una proteína implica inevitablemente su estructura. La introducción de algunas convenciones estructurales propias de las globinas facilitará nuestro tratamiento de la mioglobina. Tal como se ve en la Figura 5-3, los segmentos helicoidales se nombran de la A a la H. Un residuo aminoácido individual puede designarse por su posición en la secuencia de aminoácidos o por su localización dentro de la secuencia de un segmento concreto de hélice α. Por ejemplo, el residuo His coordinado al grupo hemo en la mioglobina, His^{93} (el aminoácido nº 93 desde el extremo amino-terminal de la secuencia polipeptídica de la mioglobina) se llama también HisF8 (el octavo residuo de la hélice α F). Los giros en la estructura se denominan AB, CD, EF, FG, etc., que indican los segmentos de hélice α que conectan.

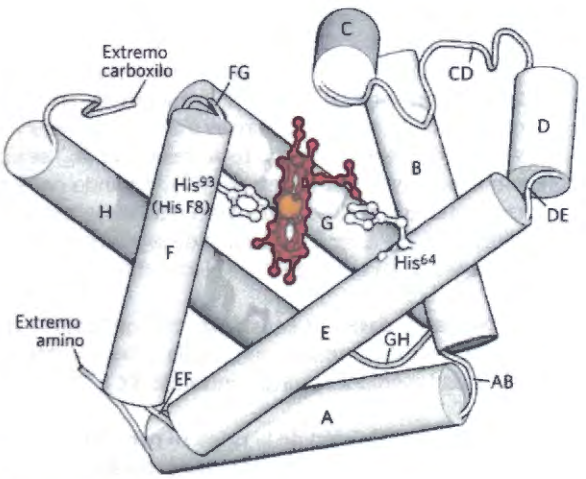


FIGURA 5-3 Mioglobina. Los ocho segmentos de hélice α (mostrados aquí como cilindros) están marcados de la A a la H. Los residuos de conexión, en los giros, que no forman parte de las hélices, se nombran AB, CD, EF, etc., indicando los segmentos que interconectan. Algunos giros, tales como BC y DE, son abruptos, y no contienen residuos; normalmente no hay un nombre específico para ellos. El grupo hemo está unido en una bolsa formada principalmente por las hélices E y F, aunque también participan algunos aminoácidos de otros segmentos. [Fuente: PDB ID 1MBO, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980.]

Las interacciones proteína-ligando se pueden describir cuantitativamente

La función de la mioglobina depende no sólo de la capacidad de la proteína de unir oxígeno, sino también de ser capaz de liberarlo cuando y donde sea necesario. La función bioquímica depende a menudo de una interacción reversible proteína-ligando de este tipo. Una descripción cuantitativa de esta interacción es, por tanto, un aspecto clave en muchas investigaciones bioquímicas. En general, la unión reversible de una proteína (P) a un ligando (L) puede describirse por una simple **ecuación de equilibrio:**

$$P + L \rightleftharpoons PL \qquad (5\text{-}1)$$

La reacción se caracteriza por una constante de equilibrio K_a, de manera que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \qquad (5\text{-}2)$$

donde k_a y k_d son constantes de velocidad (insistiremos en ellos más adelante). El término $\mathbf{K_a}$ es una **constante de asociación** (no hay que confundirla con la K_a que representa la constante de disociación de una ácido; p. 62) que describe el equilibrio existente entre el complejo y sus componentes libres no unidos. La constante de asociación proporciona una medida de la afinidad del ligando L por la proteína. La K_a tiene unidades de M^{-1}; un valor más alto de K_a corresponde a una mayor afinidad del ligando para la proteína.

El término del equilibrio K_a es también equivalente a la relación entre las velocidades de reacción hacia la derecha (asociación) y hacia la izquierda (disociación) relacionadas con la formación del complejo PL. La velocidad de asociación se describe con la constante de velocidad k_a y la de disociación con la constante de velocidad k_d. Como se discutirá en el capítulo siguiente, las constantes de velocidad son constantes de proporcionalidad que describen la fracción del total de reactivo que reacciona en una fracción de tiempo determinada. Cuando en la reacción interviene una sola molécula, como en la disociación PL → P + L, la reacción es de *primer orden* y las unidades de la constante de velocidad (k_d) se expresan como inversos del tiempo (s^{-1}). Cuando en la reacción intervienen dos moléculas, como en la reacción de asociación P + L → PL, se llama de *segundo orden* y las unidades de su constante de velocidad (k_a) son $M^{-1}s^{-1}$.

›› **Convención clave:** Las constantes de equilibrio se representan mediante una K mayúscula y las constantes de velocidad mediante una k minúscula. ‹‹

La redistribución de la primera parte de la ecuación 5-2 muestra que la relación entre proteína unida y proteína libre es directamente proporcional a la concentración de ligando libre:

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \qquad (5\text{-}3)$$

Cuando la concentración de ligando es mucho mayor que la concentración de sitios de fijación de ligando, la unión de ligando por parte de la proteína no afecta de manera significativa a la concentración de ligando libre (no unido), con lo que [L] permanece constante. Esta situación es aplicable en general a la mayoría de ligandos que se unen a las proteínas en las células y simplifica nuestra descripción del equilibrio de unión.

Podemos ahora considerar la constante de equilibrio en función de la fracción, Y, de sitios de fijación de ligando de la proteína que están ocupados por el ligando:

$$Y = \frac{\text{sitios de fijación ocupados}}{\text{sitios de fijación totales}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \qquad (5\text{-}4)$$

Sustituyendo $K_a[L][P]$ por [PL] (véase la ecuación 5-3) y reordenando los términos tenemos:

$$Y = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \qquad (5\text{-}5)$$

El valor de K_a se puede determinar a partir de una representación de Y frente a la concentración de ligando libre, [L] **(Fig. 5-4a)**. Cualquier ecuación de la forma $x = y/(y+z)$ describe una hipérbole, por lo que Y resulta ser una función hiperbólica de [L]. La fracción de sitios de fijación de ligando ocupados tiende a la saturación de manera asintótica a medida que aumenta [L]. La [L] a la que la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles están ocupados (es decir, $Y = 0{,}5$) corresponde a $1/K_a$.

Sin embargo, a veces es más frecuente (e intuitivamente más sencillo) considerar la constante de

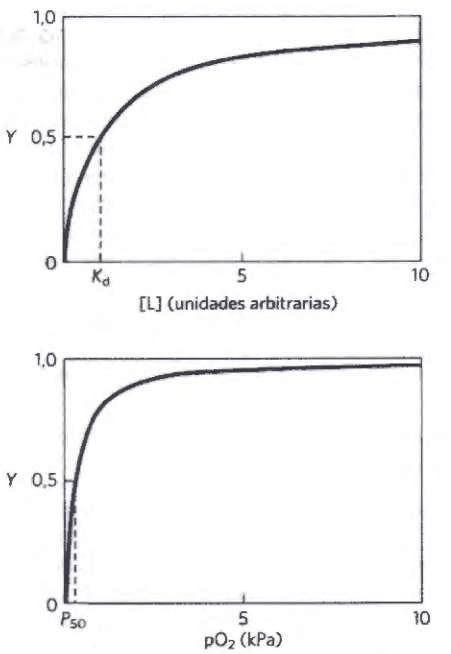
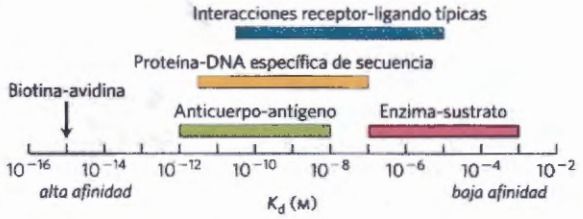


FIGURA 5-4 Representaciones gráficas de la unión de ligando. Se representa la proporción de centros de unión a ligando ocupados, Y, frente a la concentración de ligando libre. Ambas curvas son hipérbolas rectangulares. **(a)** Curva hipotética de unión a un ligando L. La [L] necesaria para ocupar la mitad de los centros de unión a ligando disponibles es equivalente a $1/K_a$ o K_d. La curva tiene una asíntota horizontal en $Y = 1$ y una asíntota vertical (no mostrada) en [L] = $-1/K_a$. **(b)** Curva representativa de la unión de oxígeno a la mioglobina. La presión parcial de O_2 en el aire sobre la solución está expresada en kilopascales (kPa). El oxígeno se une fuertemente a la mioglobina con una P_{50} de sólo 0,26 kPa.

TABLA 5-1 Constantes de disociación para algunas proteínas

Proteína	Ligando	Kd (M)[a]
Avidina (clara de huevo)	Biotina	1×10^{-15}
Receptor de insulina (humano)	Insulina	1×10^{-10}
Inmunoglobulina Anti-VIH (humana)[b]	gp41 (Proteína de superficie del VIH-1)	4×10^{-10}
Proteína de unión a níquel (*E. coli*)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulina (rata)[c]	Ca^{2+}	3×10^{-6}
		2×10^{-5}



Las barras coloreadas indican el intervalo de valores de las constantes de disociación típicas de diversas clases de interacciones en sistemas biológicos. Unas pocas interacciones, tales como la de la proteína avidina y el cofactor enzimático biotina caen fuera de los márgenes normales. La interacción avidina-biotina es tan fuerte que puede considerarse irreversible. Las interacciones proteína-DNA dirigidas por la secuencia se refieren a proteínas que se unen a una secuencia particular de nucleótidos en el DNA, en contraste con la unión general a cualquier sitio del DNA.

[a]A reported dissociation constant is valid only for the particular solution conditions under which it was measured. K_d values for a protein-ligand interaction can be altered, sometimes by several orders of magnitude, by changes in the solution's salt concentration, pH, or other variables.

[b]This immunoglobulin was isolated as part of an effort to develop a vaccine against HIV. Immunoglobulins (described later in the chapter) are highly variable, and the K_d reported here should not be considered characteristic of all immunoglobulins.

[c]Calmodulin has four binding sites for calcium. The values shown reflect the highest- and lowest-affinity binding sites observed in one set of measurements.

disociación, K_d, que es el recíproco de K_a ($K_d = 1/K_a$) y que se expresa en unidades de concentración molar (M). K_d es la constante de equilibrio para la liberación del ligando. Las ecuaciones cambian a:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \qquad (5\text{-}6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \qquad (5\text{-}7)$$

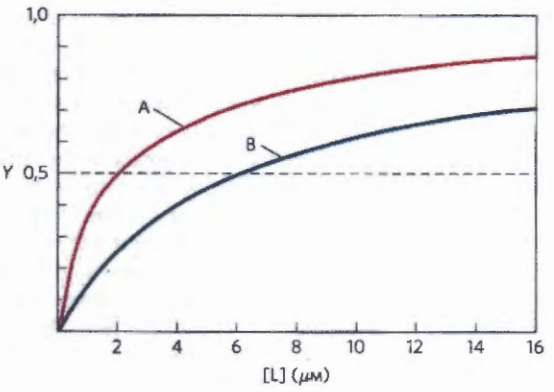
$$Y = \frac{[L]}{[L] + K_d} \qquad (5\text{-}8)$$

Cuando [L] es igual a K_d la mitad de los sitios de fijación de ligando están ocupados. Cuando [L] desciende por debajo de K_d, cada vez hay menos proteína con ligando unido. Para que un 90% de los sitios de fijación de ligando disponibles estén ocupados, [L] debe ser nueve veces mayor que K_d.

En la práctica, K_d se utiliza mucho más a menudo que K_a para expresar la afinidad de una proteína por su ligando. Observe que un valor más bajo de K_d corresponde a una mayor afinidad del ligando por la proteína. Las operaciones matemáticas pueden reducirse a frases simples: K_d equivale a la concentración molar de ligando a la cual la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles están ocupados. En este punto, se dice que la proteína ha alcanzado semi-saturación con respecto a la unión de ligando. Cuanto más fuerte es la unión de una proteína a su ligando, menor será la concentración de ligando requerida para que estén ocupados la mitad de los sitios de fijación, y por tanto menor será el valor de K_d. En la tabla 5-1 se proporcionan algunas constantes de disociación significativas; la escala muestra el intervalo de valores típico de las constantes de disociación observadas en sistemas biológicos.

EJEMPLO PRÁCTICO 5-1 Constantes de disociación receptor-ligando

Dos proteínas A y B, se unen al mismo ligando L, y presentan las curvas de unión que se muestran a continuación.



¿Cuál es la constante de disociación, K_d, de cada proteína? ¿Qué proteína (A o B) tiene mayor afinidad por el ligando L?

Solución: Podemos determinar las constantes de disociación examinando la gráfica. Puesto que Y representa la fracción de sitios de fijación ocupados por el ligando, la concentración de ligando a la que están ocupados la mitad de los sitios, es decir, el punto en el que la curva de fijación cruza la línea donde $Y = 0{,}5$, es la constante de disociación. Para A, $K_d = 2\ \mu M$; para B, $K_d = 2\ \mu M$. Dado que A está semi-saturada a valores más bajos de [L], tiene mayor afinidad por el ligando.

La unión de oxígeno a la mioglobina sigue los patrones descritos anteriormente. Sin embargo, al ser el oxígeno un gas, debemos hacer algunos ajustes mínimos en las ecuaciones para poder proceder con más facilidad a los experimentos de laboratorio necesarios. En primer lugar sustituimos la concentración de oxígeno disuelto por [L] en la ecuación 5-8 para tener

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \qquad (5\text{-}9)$$

Como para cualquier ligando, K_d es igual a la $[O_2]$ a la que están ocupados la mitad de los sitios de fijación de ligando disponibles, o $[O_2]_{0,5}$. La ecuación 5-9 pasa a ser

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \qquad (5\text{-}10)$$

En los experimentos en los que el oxígeno es el ligando, el parámetro que varía es la presión parcial de oxígeno (pO_2) en la fase gaseosa que se encuentra sobre la disolución debido a que es más fácil de medir que la concentración de oxígeno disuelto. La concentración de una sustancia volátil en disolución es siempre proporcional a la presión parcial local del gas. Si definimos la presión parcial de oxígeno a $[O_2]_{0,5}$ como P_{50} la sustitución en la ecuación 5-10 da

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \qquad (5\text{-}11)$$

En la Figura 5-4b se muestra una curva de unión para la mioglobina que relaciona θ con pO_2 .

La estructura proteica afecta al modo de unión del ligando

La unión de un ligando a una proteína no acostumbra a ser tan simple como podrían hacer pensar las ecuaciones vistas anteriormente. La interacción se ve afectada en gran medida por la estructura proteica y suele ir acompañada de cambios conformacionales. Por ejemplo, la especificidad con la que el grupo hemo se une a sus diversos ligandos se ve alterada cuando el hemo es un componente de la mioglobina. El monóxido de carbono se une a las moléculas de hemo libre unas 20.000 veces mejor que el O_2 a las moléculas libres de grupo hemo (es decir, la K_d o P_{50} para la unión del CO es más de 20.000 veces menor que la del O_2) pero sólo se une unas 40 veces mejor que el O_2 cuando el grupo hemo está unido a la mioglobina. En el caso del hemo libre, la más fuerte unión del CO refleja diferencias en la forma en que las estructuras orbitales del CO y el O_2 interaccionan con el Fe^{2+}. Estas mismas estructuras orbitales conducen a geometrías diferentes cuando se unen al hemo **(Fig. 5-5a, b)**. La variación en la afinidad relativa del CO y el O_2 hacia el hemo cuando éste está unido a una globina se debe a la estructura de la globina.

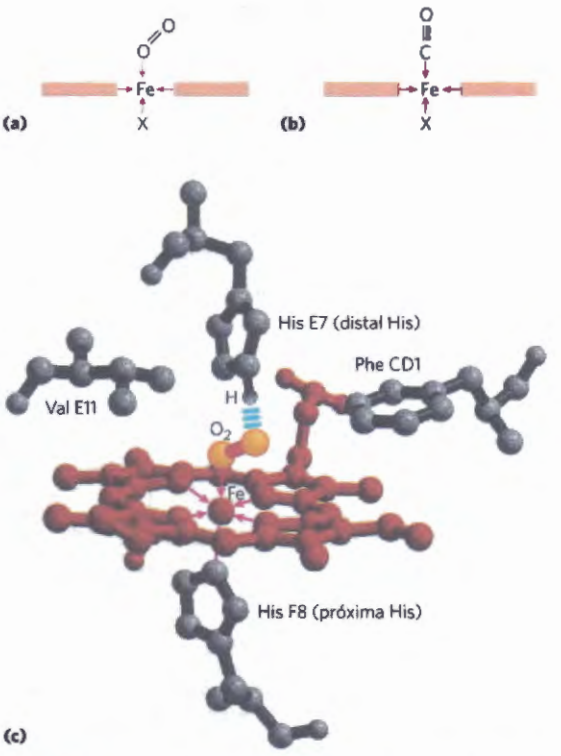


FIGURA 5-5 Efectos estéricos causados por la unión de ligando al grupo hemo de la mioglobina. (a) El oxígeno se une al grupo hemo con el eje del O_2 en ángulo, una conformación del enlace facilitada por la mioglobina. **(b)** El monóxido de carbono se une al hemo libre con el eje del CO perpendicular al plano del anillo de porfirina. **(c)** Otra perspectiva del hemo de la mioglobina muestra la disposición de los residuos aminoácidos clave alrededor del hemo. El O_2 unido forma un enlace de hidrógeno con la His distal, la His E7 (His^{64}), facilitando más aún la unión del O_2. [Fuente: (c) Derivado de PDB ID 1M8O, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142: 531, 1980.]

Cuando el hemo está unido a la mioglobina su afinidad hacia el O_2 aumenta de modo selectivo por la presencia de la **His distal** (His^{64}, o His E7 de la mioglobina). El complejo Fe-O_2 es mucho más polar que el complejo Fe-CO. Hay una carga negativa parcial distribuida a través de los átomos de oxígeno del O_2 ligado debido a la oxidación parcial del átomo de Fe que interactúa. Un puente de hidrógeno entre el imidazol de la cadena lateral de la His E7 y el oxígeno ligado estabiliza electrostáticamente este complejo polar (Fig. 5-5c). La afinidad de la mioglobina hacia el O_2 aumenta así de forma selectiva en un factor de aproximadamente 500; este efecto no existe en la unión Fe-CO en la mioglobina. En consecuencia, la afinidad de unión umas 20.000 veces más fuerte del hemo libre hacia el CO en comparación con el O_2 disminuye hasta aproximadamente 40 veces cuando el hemos está incrustado en la mioglobina. Este efecto electrostático favorable sobre la unión del O_2 es aún más espectacular en las hemoglobinas de algunos invertebrados, en las que dos grupos presentes en la bolsa de unión pueden formar enlaces de

hidrógeno fuertes con el O_2 lo que hace que el grupo hemo fije el O_2 con mayor afinidad que el CO. Este incremento selectivo de la afinidad del O_2 hacia las globinas es fisiológicamente importante y contribuye a disminuir el envenenamiento por CO generado a partir del catabolismo del hemo (véase el Capítulo 22) o a partir de otras fuentes.

La unión del O_2 al hemo en la mioglobina también depende de movimientos moleculares, o "respiración", en la estructura proteica. La molécula de hemo está profundamente sepultada en el polipéptido plegado, sin que haya un camino directo para el oxígeno desde la disolución hasta el sitio de fijación de ligando. Si la proteína fuese rígida, el O_2 no podría entrar o salir de la bolsa de hemo a una velocidad significativa. Sin embargo, la rápida flexión molecular de las cadenas laterales de los aminoácidos provoca la formación de cavidades transitorias en la estructura de la proteína, de manera que el O_2 puede abrirse paso moviéndose a través de esas cavidades. Las simulaciones por ordenador de las rápidas fluctuaciones estructurales de la mioglobina sugieren que hay muchos caminos para el oxígeno. La His distal actúa como una puerta que controla el acceso a una bolsa principal cerca del hierro del hemo. La rotación de ese residuo de His para abrir y cerrar la bolsa tiene lugar en una escal de tiempo del orden de nanosegundos (10^{-9} s). Incluso cambios conformacionales sutiles pueden ser claves para la actividad proteica.

La His distal funciona de una forma algo diferente en otras globinas. En la neuroglobina, citoglobina y algunas globinas presentes en plantas e invertebrados, la His distal está coordinada directamente con el hierro del hemo en el lugar en donde se han de fijar los ligandos. En estas globinas, el O_2 u otros ligandos, han de desplazar la His distal durante el proceso de unión formándose una vez más un enlace de hidrógeno entre la His distal y el O_2 después de que se hay producido la unión.

El oxígeno es transportado en la sangre por la hemoglobina

Prácticamente todo el oxígeno transportado por la sangre de los animales se une y transporta por la hemoglobina de los eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos). Los eritrocitos humanos normales son discos bicóncavos pequeños (de 6 a 9 μm de diámetro). Se forman a partir de células madre precursoras llamadas **hemocitoblastos**. En el proceso de maduración, las células madre generan células hija que producen grandes cantidades de hemoglobina y, a continuación, pierden sus órganos intracelulares (núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático). Los eritrocitos son por lo tanto células vestigiales incompletas, incapaces de reproducirse y, en los humanos, destinadas a sobrevivir durante tan solo unos 120 días. Su principal función es transportar hemoglubina la cual está disuelta en su citosol a una concentración muy alta (aproximadamente un 34% de su peso).

En la sangre arterial que pasa de los pulmones a los tejidos periféricos, a través del corazón, la hemoglobina está saturada en un 96% con oxígeno. En la sangre venosa que vuelve al corazón la hemoglobina está saturada sólo en un 64%. Por lo tanto, cada 100 mL de sangre que pasa a través de los tejidos libera aproximadamente un tercio del oxígeno que transporta, o 6,5 mL de O_2 gaseoso a presión atmosférica y temperatura corporal.

La mioglobina, con su curva hiperbólica de unión al oxígeno (Fig. 5-4b), es relativamente insensible a pequeños cambios en la concentración del oxígeno disuelto y por lo tanto funciona bien como una proteína de almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina, con sus múltiples subunidades y sitios de fijación de O_2, está mejor preparada para el transporte de oxígeno. Tal como veremos, las interacciones entre las subunidades de una proteína multimérica pueden permitir una respuesta altamente sensible a pequeños cambios en la concentración de ligando. Las interacciones entre las subunidades de la hemoglobina provocan cambios conformacionales que alteran la afinidad de la proteína por el oxígeno. La modulación de la unión del oxígeno permite a la proteína transportadora de O_2 responder a los cambios en la demanda de oxígeno por parte de los tejidos.

Las subunidades de la hemoglobina son estructuralmente similares a la mioglobina

La hemoglobina (M_r 64.500; abreviada como Hb) es más o menos esférica, con un diámetro de 5,5 nm. Es una proteína tetramérica que contiene cuatro grupos prostéticos hemo, cada uno asociado a una de las cadenas polipeptídicas. La hemoglobina de un adulto contiene dos tipos de globina, dos cadenas α (de 141 residuos cada una) y dos cadenas β (de 146 residuos cada una). A pesar de que menos de la mitad de los residuos de aminoácidos de las secuencias polipeptídicas de las subunidades α y β son idénticos, las estructuras tridimensionales de los dos tipos de subunidades son muy similares. Más aún, sus estructuras son muy similares a la de la mioglobina **(Fig. 5-6)**, a pesar de que las secuencias de aminoácidos de los tres polipéptidos son idénticas en sólo 27 posiciones **(Fig. 5-7)**. Los tres polipéptidos son miembros de la familia proteica de las globinas. La convención para nombrar las hélices descrita en el caso de la mioglobina es también aplicable a los polipéptidos de la hemoglobina, excepto que la subunidad α carece de la corta hélice D. La bolsa de unión del hemo está formado principalmente por las hélices E y F de cada una de las subunidades.

La estructura cuaternaria de la hemoglobina muestra fuertes interacciones entre subunidades diferentes. En la interfase $\alpha_1\beta_1$ (y su equivalente $\alpha_2\beta_2$) intervienen más de 30 residuos y es suficientemente fuerte como

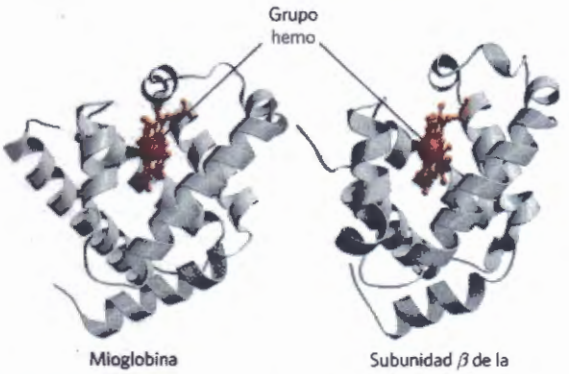


FIGURA 5-6 Comparación de las estructuras de la mioglobina [Fuentes: (izquierda) PDB ID 1MBO), S. E. Phillips. *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980. (derecha) de de PDB ID 1HGA. R. Liddington et al. *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992]

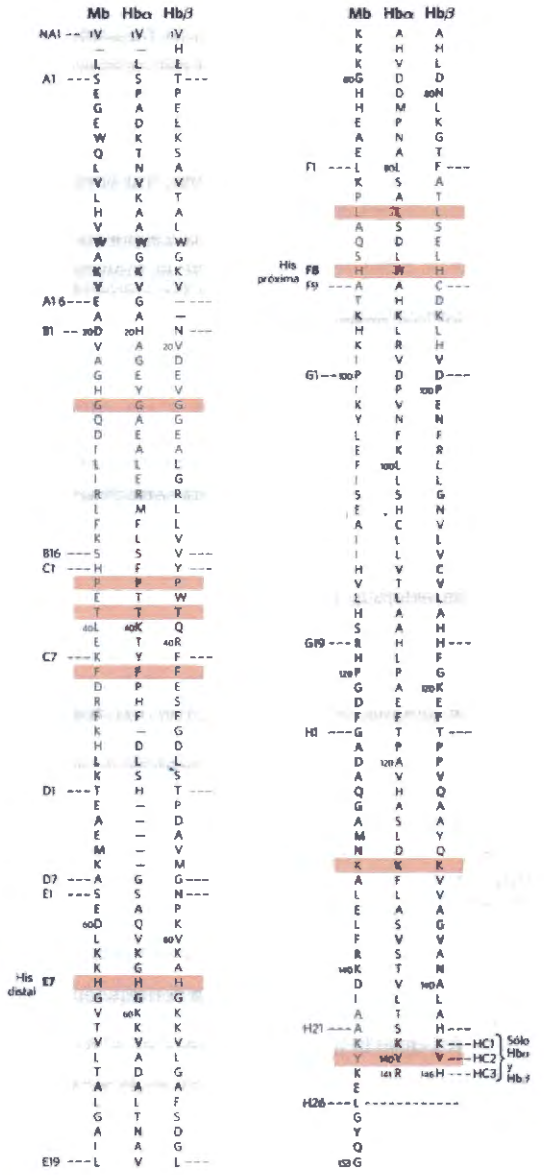


FIGURA 5-7 Secuencias de aminoácidos de la mioglobina de cachalote y de las cadenas α y β de la hemoglobina humana. Las líneas discontinuas señalan los límites de las hélices. Para alinear las secuencias de una manera óptima se han incluido algunos huecos cortos en las dos secuencias de Hb en los lugares en donde hay un exceso de aminoácidos en las otras secuencias comparadas. Con la excepción de la hélice D, ausente en la cadena α de la Hb (Hbα), este alineamiento permite la designación por letras de las hélices que ayuda a destacar la posición común de los aminoácidos idénticos en las tres estructuras (sombreados). Los residuos destacados en rosa están conservados en todas las globinas conocidas. Hay que tener en cuenta que una misma designación de letra y número para aminoácidos no corresponde necesariamente con una posición común en la secuencia lineal de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, el residuo His distal es His E7 en las tres estructuras pero corresponde a la His^{64}, His^{58} e His^{63} en las secuencias lineales de la Mb, Hbα y Hbβ, respectivamente. Los residuos amino y carboxilo-terminales que no pertenecen a hélices, situados más allá del primer (A) y último (H) de los segmentos en hélice α, se designan como NA y HC, respectivamente.

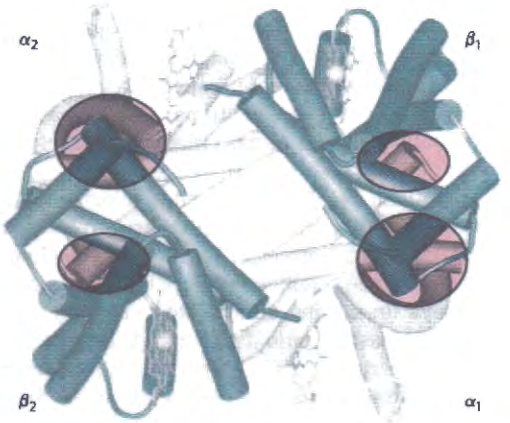


FIGURA 5-8 Interacciones dominantes entre las subunidades de hemoglobina. En esta representación, las subunidades α están en tono claro y las subunidades β en oscuro. Las interacciones más fuertes (destacadas) se producen entre subunidades no iguales. Cuando se une el oxígeno, el contacto $\alpha_1\beta_1$ cambia ligeramente; sin embargo, se produce un cambio sustancial en el contacto $\alpha_1\beta_2$, donde se rompen varios pares iónicos. [Fuente: PDB 1D 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1997.]

para que, aunque un tratamiento suave con urea provoca una disociación del tetrámero en dímeros $\alpha\beta$, estos permanezcan intactos. La interfase $\alpha_1\beta_2$ (y la $\alpha_2\beta_1$) implica unos 19 residuos **(Fig. 5-8)**. El efecto hidrofóbico juega un papel importante en la estabilización de estas interfases, pero también hay muchos enlaces de hidrógeno y unos pocos pares iónicos (puentes salinos) cuya importancia se discute más adelante.

La hemoglobina experimenta un cambio estructural al unirse al oxígeno

El análisis por rayos X ha revelado dos conformaciones principales de la hemoglobina: el **estado R** y el **estado T**. A pesar de que el oxígeno se une a la hemoglobina en cualquiera de estos dos estados tiene una afinidad considerablemente mayor por la hemoglobina en estado R. La unión del oxígeno estabiliza el estado R. Cuando el oxígeno está ausente experimentalmente, el estado T es más estable y es entonces la conformación predominante de la **desoxihemoglobina**. Los estados T y R fueron denominados originalmente como "tenso" y "relajado", debido a que el estado T está estabilizado por un mayor número de pares iónicos, muchos de los cuales se encuentran en la interfase $\alpha_1\beta_2$ (y a la $\alpha_2\beta_1$) **(Fig. 5-9)**. La unión del O_2 a una subunidad de hemoglobina en el estado T promueve un cambio conformacional hacia el estado R. Cuando toda la proteína sufre esta transición, las estructuras de las subunidades individuales cambian poco, pero los pares de subunidades $\alpha\beta$ se deslizan uno sobre otro y rotan, estrechando la bolsa entre las subunidades β **(Fig. 5-10)**. En este proceso, algunos de los pares iónicos que estabilizan el estado T se rompen y se forman otros nuevos.

Max Perutz propuso que la transición T → R está provocada por cambios en las posiciones de cadenas laterales de aminoácidos clave que rodean al hemo. En el estado T, la porfirina está ligeramente curvada, provocando que el hierro del hemo sobresalga ligeramente hacia la His próxima (His F8). La unión del O_2 provoca

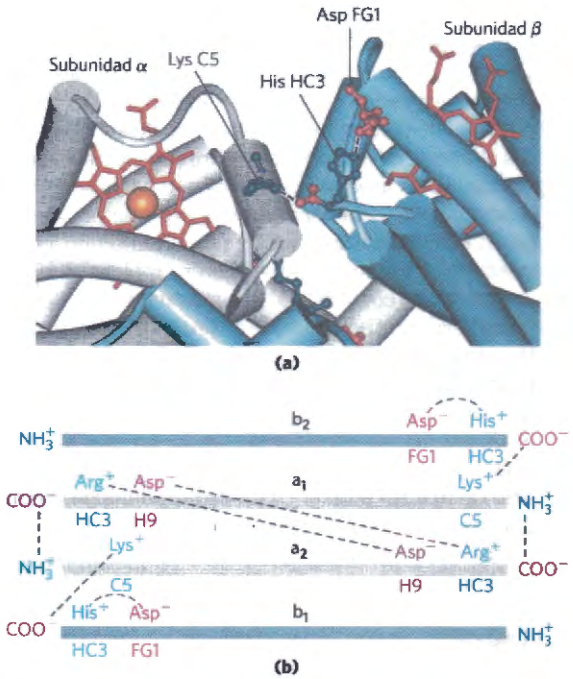


FIGURA 5-9 Algunos pares iónicos que estabilizan el estado T de la desoxihemoglobina (a) Visión en detalle de una porción de una molécula de desoxihemoglobina en estado T. Las interacciones entre los pares iónicos His HC3 y Asp FG1 de la subunidad β (en azul) y entre la Lys C5 de la subunidad α (en gris) y el grupo α-carboxilo de la His HC3 de la subunidad β se muestran con líneas discontinuas. (Recuérdese que el HC3 es el residuo carboxilo-terminal de la subunidad β.) **(b)** Las interacciones entre estos pares iónicos y otros no mostrados en (a) se esquematizan en esta representación de las cadenas de polipéptido extendidas de la hemoglobina. [Fuente: (a) PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

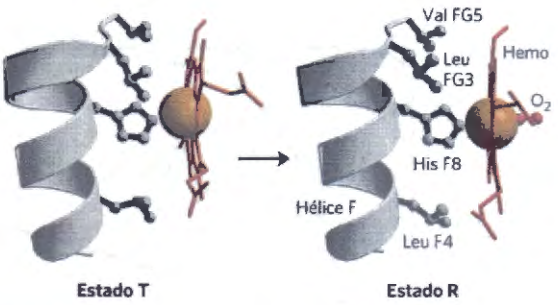


FIGURA 5-11 Cambios de conformación en el entorno del hemo por la unión del O_2 a la desoxihemoglobina. El cambio de posición de la hélice F cuando el hemo une O_2 es uno de los ajustes que se cree que desencadena la transición T → R. [Fuentes: estado T de PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992. Estado R de PDB ID 1BBB, M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17.248, 1992. El estado R está modificado para representar O_2 en lugar de CO.]

que el hemo adquiera una conformación más plana, cambiando la posición de la His próxima y de la hélice F unida **(Fig. 5-11)**. Estos cambios conducen a ajustes en los pares iónicos de la interfase $\alpha_1\beta_2$.

La hemoglobina une oxígeno de manera cooperativa

La hemoglobina debe unir oxígeno eficientemente en los pulmones, donde la pO_2 es aproximadamente de 13,3 kPa, y liberar oxígeno en los tejidos, donde la pO_2 es de unos 4 kPa. La mioglobina, como cualquier proteína que une oxígeno siguiendo una curva hiperbólica de unión, está poco preparada para esta función, por los motivos que se ilustran en la **Figura 5-12**. Una proteína que uniese O_2 con una alta afinidad lo uniría eficientemente en los pulmones pero no liberaría gran parte del mismo

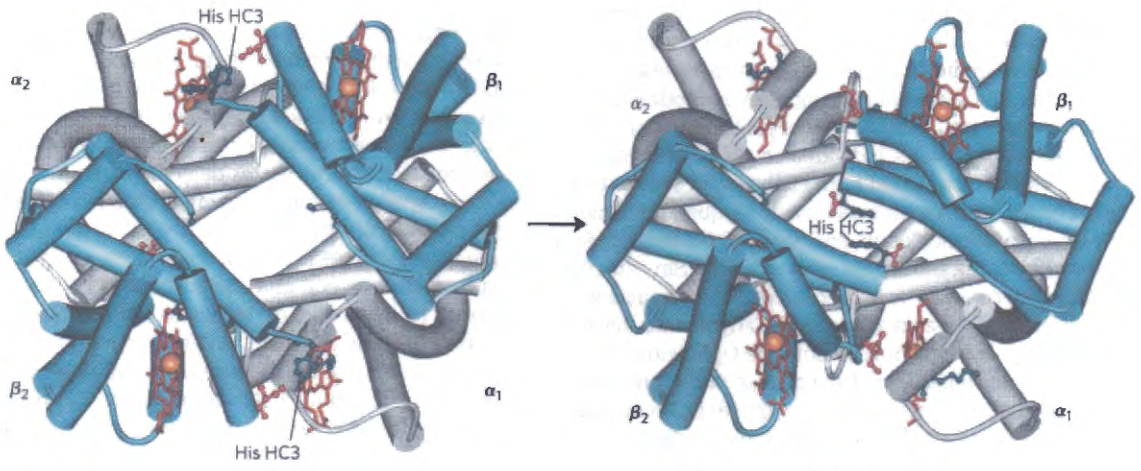


FIGURA 5-10 Transición T → R. En estas representaciones de la desoxihemoglobina, igual que en la Figura 5-9, las subunidades β se muestran en azul y las subunidades α en gris. Las cadenas laterales cargadas positivamente y los extremos de la cadena que forman pares iónicos se muestran en azul y sus correspondientes parejas cargadas negativamente se muestran en rojo. La Lys C5 de cada subunidad α y el Asp FG1 de cada subunidad β son visibles aunque no están marcados (compárese con la Fig. 5-9a). Observe que la molécula tiene una orientación ligeramente diferente de la mostrada en la Figura 5-9. La transición del estado T al R desplaza de manera sustancial las parejas de subunidades, afectando a algunos pares iónicos. Es destacable el caso de los residuos His HC3 del extremo carboxilo de las subunidades β, que forman pares iónicos en el estado T, y que rotan hacia el centro de la molécula cuando se pasa al estado R, dejando de formar pares iónicos. Otra consecuencia destacable de la transición T → R es un estrechamiento de la bolsa entre las subunidades β. [Fuentes: estado T: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992 , Estado R: PDB ID 1BBB), M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17.248, 1992.]

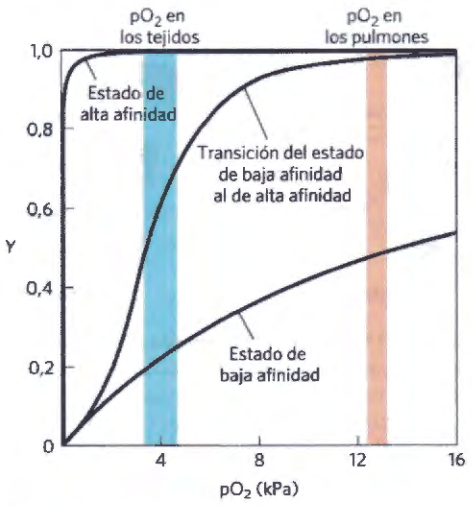


FIGURA 5-12 Curva de unión sigmoidea (cooperativa). Una curva de unión sigmoidea puede contemplarse como una curva híbrida que refleja la transición de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad. La unión cooperativa, tal como se manifiesta por la curva de unión sigmoidea, hace que la hemoglobina sea más sensible a pequeñas diferencias en la concentración de O_2 entre los tejidos y los pulmones, lo que permite que la hemoglobina una oxígeno en los pulmones (donde la pO_2 es alta) y lo libere en los tejidos (donde la pO_2 es baja).

en los tejidos. Si la proteína uniese oxígeno con una afinidad suficientemente baja para liberarlo en los tejidos, no recogería demasiado oxígeno en los pulmones.

La hemoglobina resuelve este problema mediante una transición de un estado de baja afinidad (el estado T) a un estado de alta afinidad (el estado R) a medida que se le unen más moléculas de O_2. El resultado es que la hemoglobina tiene una curva de unión a oxígeno híbrida, en forma de S o curva sigmoidea (Fig. 5-12). Una proteína de una sola subunidad con un único sitio de fijación de sustrato no puede tener una curva de unión sigmoidea (ni siquiera si la unión provocase un cambio conformacional) debido a que cada molécula de ligando se une independientemente y no podría afectar a la unión de otra molécula. Por el contrario, la unión del O_2 a las subunidades individuales de la hemoglobina puede alterar la afinidad para el O_2 de las subunidades adyacentes. La primera molécula de O_2 que interacciona con la desoxihemoglobina se une débilmente, debido a que se une a una subunidad en el estado T. Sin embargo, esta unión conduce a unos cambios conformacionales que se comunican a las subunidades adyacentes, haciendo más fácil la unión de moléculas de O_2 adicionales. En efecto, la transición T → R se produce más rápidamente en la segunda subunidad una vez que el O_2 se ha unido a la primera subunidad. La última molécula de O_2 (la cuarta) que se une al hemo lo hace a una subunidad que ya está en el estado R y por tanto se une con una afinidad mucho mayor que la de la primera molécula.

Una **proteína alostérica** es aquélla en la cual la unión de un ligando a un sitio afecta a las propiedades de unión de otro sitio de la misma proteína. El término "alostérico" proviene del griego *allos*, "otro" y *stereos*, "sólido" o "forma". Las proteínas alostéricas son aquéllas que tienen "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de ligandos conocidos como **moduladores**. Los cambios conformacionales inducidos por el/los modulador(es) interconvierten formas más activas y menos activas de la proteína. Los moduladores de las proteínas alostéricas pueden ser tanto inhibidores como activadores. Cuando el ligando normal y el modulador son idénticos la interacción se denomina **homotrópica**. Cuando el modulador es una molécula diferente del ligando normal la interacción es **heterotrópica**. Algunas proteínas tienen dos o más moduladores y por lo tanto pueden tener interacciones homotrópicas y heterotrópicas.

La unión cooperativa de un ligando a una proteína multimérica, tal como la que se produce con la unión del O_2 a la hemoglobina, es una forma de unión alostérica. La unión de un ligando afecta a las afinidades de cualquiera de los restantes sitios de fijación no ocupados, y el O_2 puede ser considerado tanto un ligando normal como un modulador homotrópico activador. Hay sólo un sitio de fijación para el O_2 en cada subunidad, de modo que los efectos alostéricos que dan lugar a la cooperatividad están mediados por cambios conformacionales transmitidos de una subunidad a otra por interacciones subunidad-subunidad. Una curva de unión sigmoidea es diagnóstico de una unión cooperativa. Permite una respuesta mucho más sensible a las concentraciones de ligando y es importante para la función de muchas proteínas multiméricas. El principio del efecto alostérico puede extenderse fácilmente al caso de los enzimas reguladores, tal como veremos en el Capítulo 6.

Los cambios conformacionales cooperativos dependen de variaciones en la estabilidad estructural de partes diferentes de la proteína, como se vio en el Capítulo 4. Los sitios de fijación de una proteína alostérica suelen consistir en segmentos estables próximos a segmentos relativamente inestables, siendo éstos últimos capaces de sufrir cambios frecuentes en su conformación o de llevar a cabo movimientos desorganizados **(Fig. 5-13)**. Cuando se produce la unión de un ligando, las partes móviles del sitio de fijación de una proteína pueden quedar estabilizadas en una conformación determinada que afecta a la conformación de las subunidades de polipéptido adyacentes. Si la totalidad del sitio de fijación tuviera una gran estabilidad, al unirse en él un ligando tan solo serían posibles cambios estructurales limitados que se propagan a otras partes de la proteína.

Al igual que ocurre con la mioglobina, la hemoglobina puede unir ligandos diferentes al oxígeno. Un ejemplo importante es el monóxido de carbono, que se une a la hemoglobina con una eficiencia unas 250 veces superior a la del oxígeno (el enlace de hidrógeno crítico entre el O_2 y la His distal no es tan fuerte en la hemoglobina humana como lo es en la mayoría de mioglobinas de mamíferos, por lo que la unión del O_2 en comparación a la del CO no aumenta tanto). La exposición de humanos al CO puede tener consecuencias trágicas (Recuadro 5-1).

La unión cooperativa de ligando puede ser descrita cuantitativamente

La unión cooperativa del oxígeno por la hemoglobina fue analizada por primera vez por Archibald Hill en 1910. A partir de su trabajo se enunció un método general para el estudio de la unión cooperativa de ligandos a proteínas multisubunitarias.

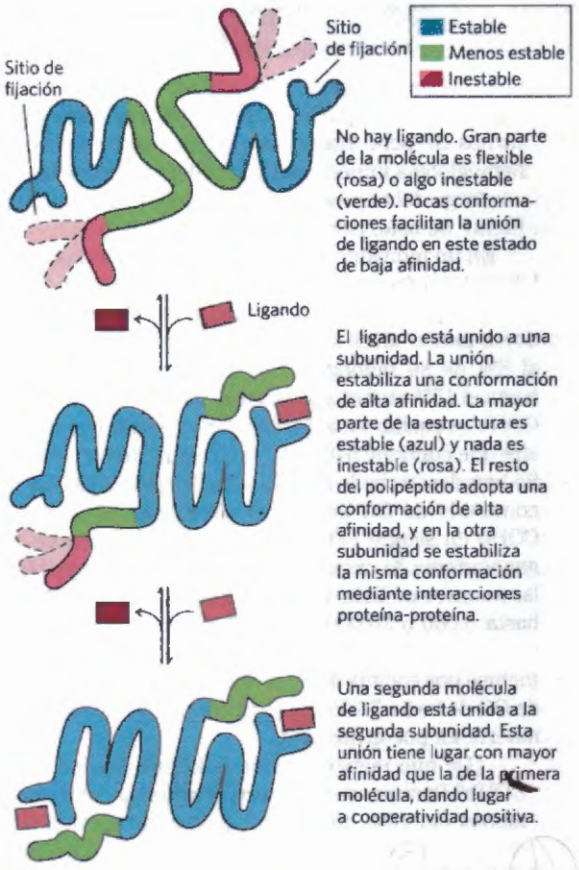


FIGURA 5-13 Cambios estructurales en una proteína con varias subunidades que se une cooperativamente a un ligando. La estabilidad estructural no es uniforme en una molécula de proteína. Aquí se muestra una proteína dimérica hipotética formada por regiones de estabilidad alta (azul), media (verde) y baja (rojo). Los sitios de fijación de ligando están compuestos de segmentos de alta y baja estabilidad, por lo que la afinidad por el ligando es relativamente baja. Los cambios conformacionales producidos al unirse el ligando hacen que la proteína pase desde un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad, una forma de encaje inducido.

Para una proteína con n sitios de fijación el equilibrio de la Ecuación 5-1 se convierte en

$$P + nL \rightleftharpoons PL_n \tag{5-12}$$

y la expresión para la constante de asociación pasa a ser

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \tag{5-13}$$

La ecuación para Y (véase la Ec. 5-8) es

$$Y = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \tag{5-14}$$

Reordenando los términos y calculando el logaritmo de ambos lados obtenemos

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{[L]^n}{K_d} \tag{5-15}$$

$$\log\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = n \log [L] - \log K_d \tag{5-16}$$

donde $K_d = [L]^n_{0,5}$.

La ecuación 5-16 es la **ecuación de Hill**, y una representación del log[Y/(1-Y)] frente al log[L] se denomina **representación de Hill**. Basándose en la ecuación, la representación de Hill debería tener una pendiente igual a n. Sin embargo, la pendiente determinada experimentalmente no refleja el número de sitios de fijación sino el grado de interacción entre ellos. La pendiente para una curva de Hill se indica por tanto como n_H, el **coeficiente de Hill**, que es una medida del grado de cooperatividad. Si n_H es igual a 1, la unión del ligando no es cooperativa, una situación que puede producirse incluso en una proteína multimérica si las subunidades no se comunican. Un n_H mayor que 1 indica que hay una cooperatividad positiva en la unión del ligando. Ésta es la situación que se observa en la hemoglobina, en la que la unión de una molécula de ligando facilita la unión de las otras. El límite superior teórico para n_H se alcanza cuando $n_H = n$. En este caso la unión sería completamente cooperativa: todos los sitios de fijación en una proteína unirían el ligando simultáneamente, y no habría moléculas de proteína parcialmente saturadas de ligando en ningún caso. Este límite nunca se alcanza en la práctica, y el valor medido de n_H es siempre menor que el número de sitios de fijación de ligando de la proteína.

Un n_H menor que 1 indica cooperatividad negativa, en la que la unión de una molécula de ligando *dificulta* la unión de otras. Hay pocos casos bien documentados de cooperatividad negativa.

Para adaptar la ecuación de Hill a la unión de oxígeno por parte de la hemoglobina debemos sustituir de nuevo [L] por pO_2 y K_d por $P_{50}{}^n$:

$$\log\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \tag{5-17}$$

Las representaciones de Hill para la mioglobina y la hemoglobina se presentan en la **Figura 5-14.**

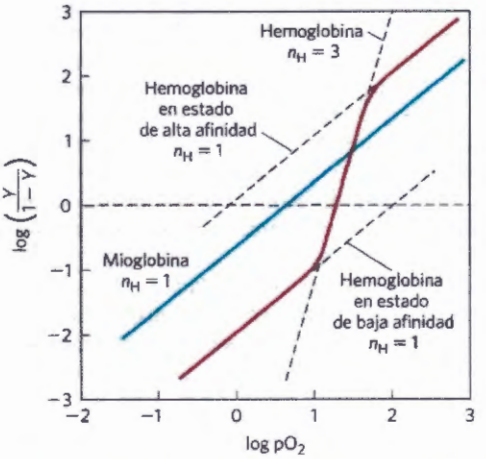


FIGURA 5-14 Gráficas de Hill para la unión del oxígeno a la mioglobina y a la hemoglobina. Cuando $n_H = 1$ no existe cooperatividad evidente. El máximo grado de cooperatividad observado para la hemoglobina corresponde aproximadamente a $n_H = 3$. Obsérvese que, mientras esto indica un alto nivel de cooperatividad, n_H es menor que n, siendo n el número de sitios de fijación de O_2 de la hemoglobina. Esto es lo normal para una proteína que presenta comportamiento alostérico.

RECUADRO 5-1 MEDICINA Monóxido de carbono: un asesino silencioso

Lake Powell, Arizona agosto de 2000. Una familia se encontraba de vacaciones en una casa flotante arrendada. Pusieron en marcha el generador de electricidad para poder conectar un aparato de aire acondicionado y un televisor. Aproximadamente 15 minutos después, dos hermanos de 8 y 11 años saltaron desde la cubierta de popa. Inmediatamente debajo de la cubierta estaba situado el tubo de escape del generador. En el lapso de dos minutos, los dos hermanos quedaron rendidos a causa de la inhalación del monóxido de carbono del tubo de escape, que había quedado concentrado en el espacio de debajo de la cubierta. Ambos se ahogaron. Estas muertes, junto con otras más que ocurrieron en la década de 1990 y que estaban relacionadas con casas flotantes de diseño similar, hicieron que se reconsiderara y rediseñara el montaje de los tubos de escape de los generadores.

El monóxido de carbono (CO), un gas incoloro e inodoro, es responsable de más de la mitad de las muertes anuales por envenenamiento en todo el mundo. El CO tiene una afinidad por la hemoglobina unas 250 veces mayor que la del oxígeno. En consecuencia, niveles relativamente bajos de CO pueden tener importantes y trágicos efectos. Cuando el CO se combina con la hemoglobina, el complejo resultante se denomina carboxihemoglobina o COHb.

Algunos procesos naturales generan cierta cantidad de CO, pero los niveles elevados localizados suelen ser el resultado de la actividad humana. Los tubos de escape de motores y estufas constituyen fuentes importantes de CO, al ser éste un producto secundario de la combustión incompleta de combustibles fósiles. Tan solo en los Estados Unidos, casi 4.000 personas mueren cada año a causa de envenenamiento por CO, ya sea accidental o intencionadamente. Muchas de las muertes accidentales se producen por un aumento no detectado de CO en espacios cerrados, como el que se produce cuando una estufa doméstica no funciona bien o tiene pérdidas e insufla CO dentro de la casa. Sin embargo, también es posible la intoxicación por CO en espacios abiertos, en los que personas desprevenidas pueden inhalar los gases de escape de generadores, motores fuera borda, motores de tractor, vehículos recreativos o cortadoras de césped.

Es poco frecuente que los niveles de monóxido de carbono en la atmósfera sean peligrosos, ya que oscilan entre menos de 0,05 partes por millón (ppm) en áreas remotas e inhabitadas y 3 a 4 ppm en algunas ciudades del hemisferio norte. En los Estados Unidos el límite impuesto por el gobierno (por la Ocupational Safety and Health Administration, OSHA) para las cantidades de CO en lugares de trabajo es de 50 ppm para personas que trabajen en turnos de ocho horas. La fuerte unión del CO a la hemoglobina implica que la COHb se puede acumular a lo largo del tiempo si las personas se exponen a una fuente de bajo, pero constante, nivel de CO .

En un individuo sano, el 1% o menos de la hemoglobina total forma complejo en forma de COHb. Al ser el CO un producto del humo del tabaco, muchos fumadores tienen niveles de COHb en un intervalo del 3% al 8% de su hemoglobina total, pudiendo aumentar hasta el 15% en fumadores compulsivos. Los niveles de COHb se equilibran al 50% en las personas que aspiran aire que contiene 570 ppm de CO durante varias horas. Se han desarrollado métodos fiables para relacionar el contenido de CO en la atmósfera con los niveles de COHb en sangre (Fig. 1) En pruebas efectuadas con generadores de casas flotantes como el responsable de las muertes de Lake Powell, los niveles de CO subieron hasta 6.000 o 30.000 ppm bajo cubierta, y los niveles de O_2 atmosférico bajaron desde un 21% a un 12%. Incluso por encima de la cubierta se detectaron niveles de CO de hasta 7.200 ppm, suficientes para provocar la muerte en pocos minutos.

¿De qué manera afecta al organismo humano la COHb? Raramente se observan síntomas a niveles de menos del 10% de la hemoglobina total. Al 15% se empieza a experimentar ligeros dolores de cabeza. Entre el 20% y el 30%, el dolor de cabeza es muy

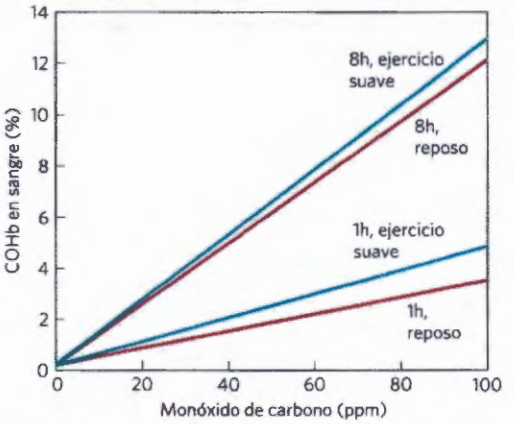


FIGURA 1 Relación entre los niveles de COHb en sangre y la concentración de CO en el aire circundante. Se muestran cuatro condiciones de exposición diferentes, comparando los efectos de una exposición corta con otra más prolongada y una exposición en reposo con una exposición durante el ejercicio. [Fuente: Datos de R.F. Coburn et al., *J. Clin. Invest.* 44:1899, 1965.]

Existen dos modelos que explican los mecanismos de la unión cooperativa

Los bioquímicos tienen actualmente una gran cantidad de información sobre los estados T y R de la hemoglobina, pero queda mucho por aprender sobre cómo se produce la transición T ⟶ R. Existen dos modelos para la unión cooperativa de ligandos a las proteínas con múltiples sitios de fijación que han influenciado en gran medida las ideas que se tienen sobre este problema.

El primer modelo fue el propuesto por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeux en 1965, es el llamado **modelo MWC** o **modelo concertado (Fig. 5-15a)**. En el modelo concertado se considera que las subunidades de una proteína con unión cooperativa son funcionalmente idénticas, que cada subunidad puede

agudo y suele estar acompañado de náuseas, vértigo, confusión, desorientación y algunos trastornos visuales; estos síntomas suelen desaparecer si se trata al individuo con oxígeno. A niveles de COHb del 30% al 50%, los síntomas neurológicos se hacen más graves y a niveles próximos al 50% se pierde la conciencia y se corre el peligro de caer en coma. Seguidamente puede producirse una parada respiratoria. Si la exposición ha sido prolongada pueden producirse daños permanentes. Niveles superiores al 60% suelen ser mortales. La autopsia de los niños que murieron en Lake Powell reveló que sus niveles de COHb eran del 59% y del 52%.

La unión de CO a la hemoglobina está afectada por muchos factores, entre los que se incluye el ejercicio (Fig. 1) y los cambios en la presión del aire relacionados con la altitud. Al tener los fumadores niveles basales más elevados de COHb, los que se exponen a una fuente de CO suelen presentar síntomas más rápidamente que los no fumadores. Las personas afectadas de enfermedades cardíacas, pulmonares o sanguíneas que reducen la disponibilidad del oxígeno a los tejidos también experimentan los síntomas a niveles más bajos de exposición. Los fetos corren un riesgo elevado de envenenamiento por CO porque la hemoglobina fetal tiene una afinidad ligeramente más elevada por el CO que la adulta. Se han registrado casos en los que el feto ha muerto pero la madre ha sobrevivido.

Puede parecer chocante que la pérdida de la mitad de la hemoglobina en forma de COHb resulte fatal, puesto que sabemos que personas con diversos tipos de anemia suelen vivir razonablemente bien con la mitad de la cantidad total de hemoglobina. Sin embargo, la unión de CO a la hemoglobina tiene efectos más allá del de eliminar parte de proteína del total disponible para la unión del oxígeno. También afecta a la afinidad del resto de subunidades de la hemoglobina para con el oxígeno. Al unirse CO a una o dos subunidades de un tetrámero de hemoglobina, la afinidad hacia el O_2 se incrementa sustancialmente en las restantes subunidades (Fig. 2). De este modo, un tetrámero de hemoglobina con dos moléculas de CO unidas puede fijar O_2 de modo eficiente en los pulmones pero liberarlo con poca eficiencia en los tejidos. Con ello, los tejidos sufren pronto una privación de oxígeno. El problema se acentúa porque los efectos del CO no se limitan a su interferencia con la función de la hemoglobina. El CO se une a otras proteínas con grupos hemo y a una variedad de metaloproteínas. Todavía no se conocen bien los efectos de estas interacciones, pero pueden ser responsables de algunos de los efectos a largo plazo del envenenamiento agudo pero no mortal por CO.

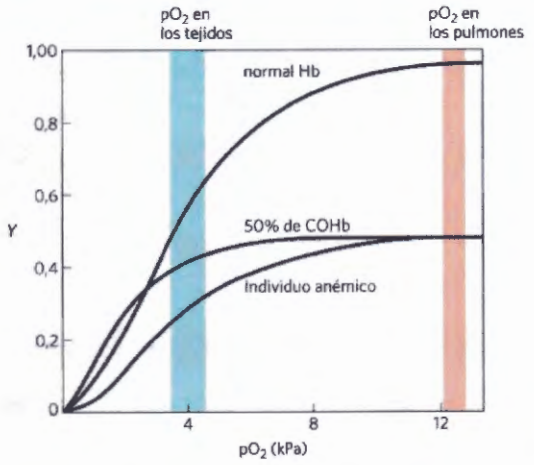


FIGURA 2 Diversas curvas de unión a oxígeno: de hemoglobina normal, hemoglobina de un individuo anémico con sólo el 50% de su hemoglobina funcional, y hemoglobina de un individuo con el 50% de sus subunidades de hemoglobina acomplejadas con CO. Se indica la pO_2 en pulmones y tejidos humanos. [Fuente: Datos de F. J. W. Roughton y R. C. Darling, *Am. J. Physiol.* 141:17, 1944.]

Cuando se sospecha un envenenamiento por CO, resulta esencial una rápida evacuación de la persona afectada de la fuente de CO, aunque esto no siempre garantiza una recuperación rápida. Cuando se produce el traslado desde un lugar contaminado con CO a una atmósfera exterior normal, el O_2 empieza a sustituir el CO de la hemoglobina. Sin embargo, los niveles de COHb descienden lentamente; el tiempo medio es de 2 a 6,5 horas, en función del individuo y de factores ambientales. Si se administra oxígeno al 100% a través de una máscara, la velocidad de recambio puede aumentar hasta cuatro veces; el tiempo medio del intercambio O_2-CO puede reducirse a decenas de minutos si se administra oxígeno al 100% a una presión de 3 atm (303 kPa). De este modo, resulta crítico el tratamiento a cargo de un equipo médico competente y bien equipado.

Está altamente recomendada la instalación de detectores de monóxido de carbono en las casas. Se trata de una medida simple y barata que puede evitar una posible tragedia. Al terminar de recopilar los datos para este recuadro, adquirimos inmediatamente detectores de CO nuevos para nuestras casas.

existir en (como mínimo) dos conformaciones, y que todas las subunidades sufren la transición de una conformación a otra de manera simultánea. En este modelo ninguna proteína tiene subunidades individuales con conformaciones diferentes. Las dos conformaciones están en equilibrio. El ligando puede unirse a cualquiera de ellas aunque de una manera mucho más fuerte al estado R. La unión sucesiva de moléculas de ligando a la conformación de baja afinidad (la cual es más estable en ausencia de ligando) hace que la transición a la conformación de alta afinidad sea más probable.

En el segundo modelo, el **modelo secuencial** (Fig. 5-15b) propuesto en 1966 por Daniel Koshland y colaboradores, la unión del ligando puede inducir un cambio de conformación en una subunidad individual. Un cambio de conformación en una subunidad hace que tanto

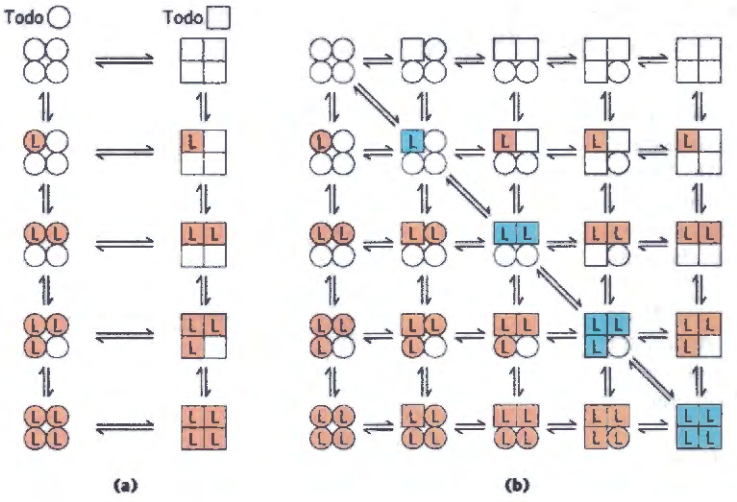


FIGURA 5-15 Dos modelos generales para la interconversión de las formas inactiva y activa de proteínas durante la unión cooperativa a ligando. A pesar de que los modelos pueden aplicarse a cualquier proteína (incluyendo cualquier enzima, Capítulo 6) que presente unión cooperativa, se muestran aquí cuatro subunidades debido a que el modelo fue propuesto originalmente para la hemoglobina. **(a)** En el modelo concertado o de todo o nada (modelo MWC) se postula que todas las subunidades están en la misma conformación, ya sea como □ (baja afinidad o inactiva) o como ○ (alta afinidad o activa). Según sea el equilibrio, K_1, entre las formas □ y ○, la unión de una o más moléculas de ligando (L) desplazará el equilibrio hacia la forma ○. Las subunidades con un L unido están sombreadas. **(b)** En el modelo secuencial cada subunidad individual puede estar en la forma □ o en la forma ○, siendo posible un gran número de conformaciones. La mayor parte de las subunidades pasan la mayoría del tiempo en los estados sombreados en azul.

un cambio similar en la subunidad adyacente como la unión de una segunda molécula de ligando sean más probables. Hay más estados intermedios potenciales en este modelo que en el modelo concertado. Los dos modelos no son mutuamente excluyentes: el modelo concertado puede considerarse como un caso límite de "todo o nada" del modelo secuencial. En el Capítulo 6 utilizaremos estos modelos para la discusión sobre los enzimas alostéricos.

La hemoglobina también transporta H^+ y CO_2

Además de transportar prácticamente todo el oxígeno necesario para las células desde los pulmones a los tejidos, la hemoglobina transporta dos productos finales de la respiración celular (H^+ y CO_2) de los tejidos a los pulmones y los riñones, donde son excretados. El CO_2 producido por la oxidación de combustibles orgánicos en la mitocondria, se hidrata para formar bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reacción está catalizada por la **carbónico anhidrasa**, un enzima especialmente abundante en los eritrocitos. El dióxido de carbono no es demasiado soluble en solución acuosa, y, de no ser convertido en bicarbonato, se formarían burbujas de CO_2 en los tejidos y en la sangre. Tal como puede verse en la reacción catalizada por la carbónico anhidrasa, la hidratación del CO_2 provoca un aumento de la concentración de H^+ (un descenso del pH) en los tejidos. La unión de oxígeno a la hemoglobina se ve muy afectada por el pH y la concentración de CO_2, por lo que la interconversión de CO_2 y bicarbonato es de gran importancia para la regulación de la unión de oxígeno y su liberación en la sangre.

La hemoglobina transporta alrededor del 40% del total de H^+ y del 15% al 20% del CO_2 formado en los tejidos hacia los pulmones y los riñones. (El resto de H^+ es absorbido por el tampón bicarbonato del plasma; el resto del CO_2 se transporta en forma de HCO_3^- y CO_2 disueltos.) La unión del H^+ y CO_2 está inversamente relacionada con la unión de oxígeno. Con un pH relativamente bajo y altas concentraciones de CO_2 en los tejidos periféricos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye a medida que se unen H^+ y CO_2, y se libera oxígeno a los tejidos. Por el contrario, a medida que se excreta CO_2 en los capilares pulmonares y aumenta consecuentemente el pH de la sangre, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta y la proteína une más O_2 para su transporte a los tejidos periféricos. Este efecto del pH y de la concentración de CO_2 sobre la unión y liberación de oxígeno por la hemoglobina es el llamado **efecto Bohr**, en honor de Christian Bohr, el fisiólogo danés (y padre del físico Niels Bohr) que lo descubrió en 1904.

El equilibrio de unión de la hemoglobina y una molécula de oxígeno puede describirse por la reacción

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

que no es una expresión completa. Para tener en cuenta el efecto de la concentración de H^+ sobre este equilibrio de unión, debemos reescribir la reacción como

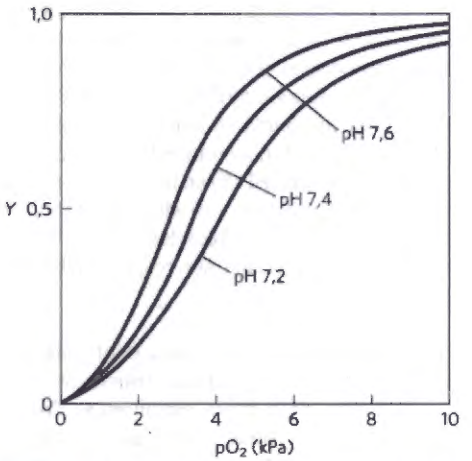


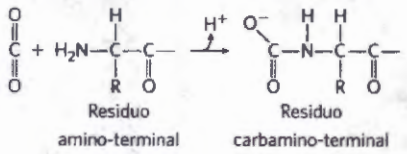
FIGURA 5-16 Efecto del pH sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina. El pH de la sangre en los pulmones es 7,6 y en los tejidos 7,2. Las medidas experimentales sobre la unión de oxígeno por la hemoglobina se suelen tomar a pH 7,4.

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

donde HHb^+ designa una forma protonada de la hemoglobina. Esta ecuación nos dice que la curva de saturación de O_2 de la hemoglobina está influenciada por la concentración de H^+ **(Fig. 5-16)**. Tanto el O_2 como el H^+ se unen a la hemoglobina, aunque con afinidades inversas. Cuando la concentración de oxígeno es alta, como ocurre en los pulmones, la hemoglobina une O_2 y libera protones. Cuando la concentración de oxígeno es baja, situación que se da en los tejidos periféricos, se une H^+ y se libera O_2.

El oxígeno y el H^+ no se unen a los mismos sitios de la hemoglobina. El oxígeno se une a los átomos de hierro de los grupos hemo, mientras que el H^+ se puede unir a diversos residuos de aminoácido de la proteína. La His^{146} (His HC3) de las subunidades β realiza un aporte fundamental al efecto Bohr. Este residuo forma, al protonarse, uno de los pares iónicos (con el Asp^{94}, Asp FG1) que ayudan a estabilizar la desoxihemoglobina en el estado T (Fig. 5-9). El par iónico estabiliza la forma protonada de la His HC3, confiriéndole a este residuo un pK_a anormalmente alto en el estado T. El pK_a cae a su valor normal de 6,0 en el estado R debido a que no puede formarse el par iónico, y este residuo está en su mayor parte desprotonado en la oxihemoglobina a pH 7,6, el pH de la sangre en los pulmones. A medida que aumenta la concentración de H^+, se produce la protonación de la His HC3, lo que favorece la transición al estado T provocando la liberación de oxígeno. Un efecto similar se produce con la protonación de los residuos amino-terminales de las subunidades α, de otros residuos His y quizás de otros grupos.

Así vemos que las cuatro cadenas polipeptídicas de la hemoglobina se comunican unas con otras no sólo por la unión de O_2 a sus grupos hemo sino también por la unión de H^+ a residuos aminoácidos específicos. Y aún hay otros elementos que añadir al entramado. La hemoglobina también une CO_2, y de modo también inversamente proporcional a la unión de oxígeno. El dióxido de carbono se une en forma de grupo carbamato al grupo α-amino del extremo amino-terminal de cada cadena de globina, formando carbaminohemoblogina:

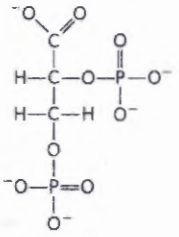


Esta reacción produce H^+ y contribuye al efecto Bohr. Los carbamatos unidos también forman puentes salinos adicionales (no mostrados en la Figura 5-9) que ayudan a estabilizar el estado T y favorecen la liberación de oxígeno.

Cuando la concentración de dióxido de carbono es alta, tal como ocurre en los tejidos periféricos, se une algo de CO_2 a la hemoglobina y la afinidad por el O_2 disminuye, haciendo que éste se libere. Por el contrario, cuando la hemoglobina llega a los pulmones, la alta concentración de oxígeno favorece la unión de O_2 y la liberación de CO_2. Es la capacidad de comunicar información de unión a ligando de una subunidad polipeptídica a las otras lo que convierte a la hemoglobina en una molécula tan perfectamente adaptada a la integración del transporte de O_2, CO_2 y H^+ por parte de los eritrocitos.

La unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada por el 2,3-bisfosfoglicerato

La interacción del **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** con las moléculas de hemoglobina perfecciona aún más la función de la hemoglobina y proporciona un ejemplo de modulación alostérica heterotrópica.



2,3-Bisfosfoglicerato

El BPG está presente en concentraciones relativamente altas en los eritrocitos. Cuando se aísla la hemoglobina contiene una cantidad significativa de BPG unido, cuya eliminación completa resulta difícil. De hecho, las

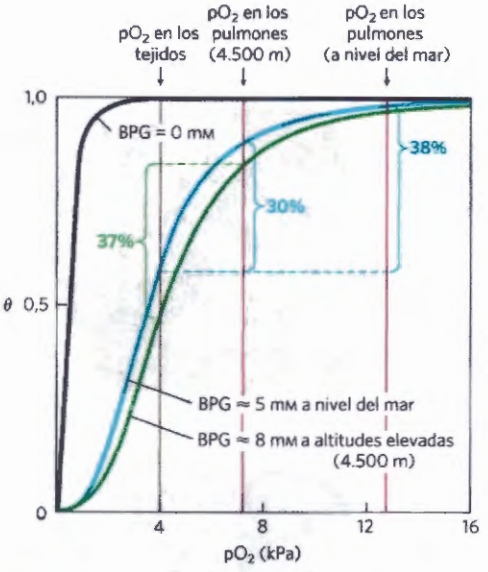


FIGURA 5-17 Efecto del 2,3-bisfosfoglicerato sobre la unión de oxígeno a la hemoglobina. La concentración de BPG en la sangre humana normal es aproximadamente 5 mM cuando se está a nivel del mar y alrededor de 8 mM a grandes altitudes. Observe que la hemoglobina une oxígeno muy fuertemente en ausencia total de BPG, presentando entonces una curva de unión hiperbólica. En realidad, el coeficiente de Hill observado para la unión cooperativa de O_2 disminuye sólo ligeramente (de 3 a 2,5) cuando se extrae el BPG de la hemoglobina, pero la parte creciente de la curva sigmoidea está confinada a una región muy pequeña cercana al origen. A nivel del mar, la hemoglobina está prácticamente saturada con O_2 en los pulmones, pero su nivel de saturación es sólo de un 60% en los tejidos, de manera que la cantidad de oxígeno liberado en los tejidos es cercana al 38% del máximo que puede ser transportado por la sangre. A grandes altitudes la liberación de O_2 disminuye aproximadamente una cuarta parte, alcanzando como máximo el 30%. Sin embargo, un aumento en la concentración de BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el O_2 haciendo que de nuevo se libere a los tejidos cerca de un 37% del oxígeno transportado.

curvas de unión a O_2 para la hemoglobina que hemos examinado hasta ahora se habían obtenido en presencia de BPG unido. Se sabe que el 2,3-bisfosfoglicerato reduce de manera considerable la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, hay una relación inversa entre la unión de O_2 y la unión de BPG. Por tanto podemos describir otro proceso de unión para la hemoglobina:

$$HbBPG + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + BPG$$

El BPG se une a un sitio alejado del sitio de fijación para el O_2 y regula la afinidad de unión de la hemoglobina para el O_2 en relación a la pO_2 en los pulmones. El BPG juega un papel importante en las adaptaciones fisiológicas a la menor pO_2 disponible a grandes alturas. Para un humano sano que se pasee a nivel del mar, la unión de oxígeno a la hemoglobina está regulada de manera que la cantidad de O_2 liberada a los tejidos equivale aproximadamente al 40 % del máximo que podría ser transportado por la sangre **(Fig. 5-17)**. Imaginemos que la misma persona se traslada rápidamente a un lugar montañoso a 4.500 m de altitud, en donde la pO_2 es considerablemente menor. La liberación de O_2 a los tejidos se ve ahora reducida. Sin embargo, después de unas pocas horas de permanencia a gran altitud, la concentración de BPG de la sangre empieza a aumentar, conduciendo a una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Este ajuste del nivel de BPG tiene un efecto pequeño sobre la unión de O_2 en los pulmones pero afecta de manera importante a la liberación de O_2 en los tejidos. El resultadoes que la liberación de oxígeno en los tejidos vuelve a ser de casi el 40 % del que puede ser transportado por la sangre. La situación se invierte cuando la persona vuelve al nivel del mar. La concentración de BPG en los eritrocitos también aumenta en las personas que sufren **hipoxia**, una disminución en la oxigenación de los tejidos periféricos debida a un funcionamiento inadecuado de los pulmones o del sistema circulatorio.

El BPG se une a la hemoglobina en la cavidad existente entre las subunidades β en el estado T **(Fig. 5-18)**. Esta cavidad está recubierta por residuos aminoácidos cargados positivamente que interaccionan con los grupos cargados negativamente del BPG. A diferencia del O_2, sólo se une una molécula de BPG a cada tetrámero de hemoglobina. El BPG disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno al estabilizar el estado T. La transición al estado R provoca un estrechamiento de la bolsa de unión a BPG, impidiendo la unión del BPG. En ausencia de BPG, la hemoglobina pasa más fácilmente al estado R.

La regulación de la unión de oxígeno a la hemoglobina por el BPG juega un papel importante en el desarrollo fetal. La hemoglobina fetal ha de tener una mayor afinidad por el O_2 que la hemoglobina materna debido a que el feto debe extraer el oxígeno de la sangre de su madre. El feto sintetiza subunidades γ en lugar de las β, formándose la hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Este tetrámero tiene una afinidad por el BPG mucho menor que la de la hemoglobina adulta normal, y por lo tanto una mayor afinidad por el oxígeno.

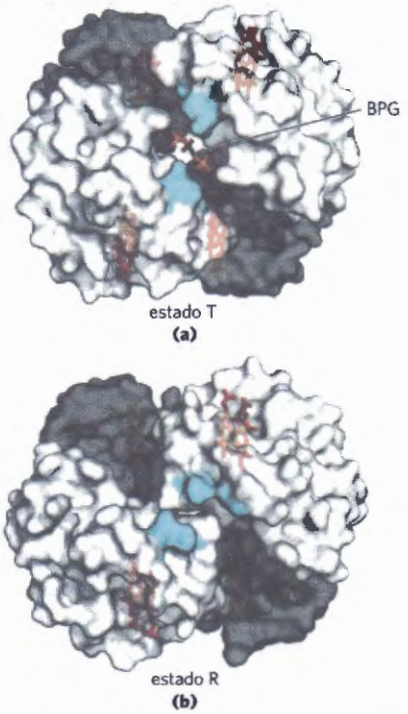


FIGURA 5-18 Unión del 2,3-bisfosfoglicerato a la desoxihemoglobina. (a) La unión del BPG estabiliza el estado T de la desoxihemoglobina. Las cargas negativas del BPG interaccionan con varios grupos cargados positivamente (mostrados en azul en esta imagen de contorno de superficie) que rodean a la bolsa entre las subunidades β en el estado T. **(b)** La bolsa de unión para el BPG desaparece con la oxigenación, produciéndose la transición al estado R). (Compare con la Fig. 5-10). [Fuentes: (a) PDB ID 1B86, V. D. Richard et al., *J. Mol. Biol.* 232:270, 1993. (b) PDB ID 1B8B, M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17248, 1992.]

La anemia falciforme es una enfermedad molecular de la hemoglobina

La enfermedad humana hereditaria llamada anemia falciforme demuestra de manera indiscutible la gran importancia de la secuencia de aminoácidos para determinar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas globulares y, por tanto, sus funciones biológicas. Se conocen más de 500 variantes genéticas de la hemoglobina en la población humana; con pocas excepciones, se trata de variantes muy raras. La mayoría de estas variantes se deben a diferencias en

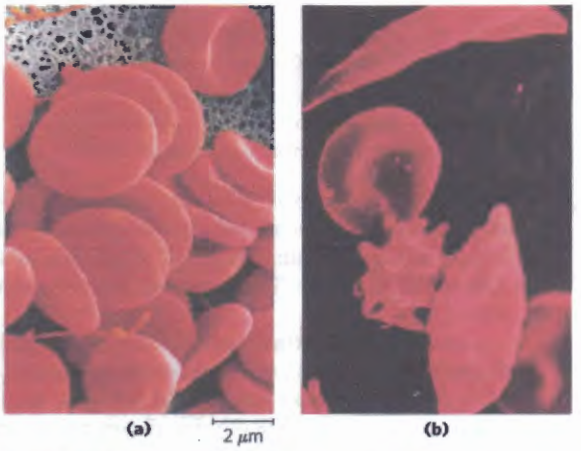


FIGURA 5-19 Comparación de eritrocitos cóncavos normales y uniformes **(a)** con los eritrocitos de formas diversas presentes en la anemia falciforme que pueden ser normales, falciformes o espiculados. [Fuentes: (a) Syred/Science Source. (b) Jackie Lewin, Royal Free Hospital/Science Source.]

un único residuo aminoácido. Los efectos sobre la estructura y función de la hemoglobina suelen ser muy pequeños, aunque a veces pueden llegar a ser extraordinarios. Cada variante de hemoglobina es el producto de una alteración genética. A cada variante de un gen se le llama alelo. Debido a que los humanos poseen en general dos copias de cada gen, un individuo puede tener dos copias de un alelo (siendo entonces homocigoto para ese gen) o una copia de cada uno de los dos alelos diferentes (heterocigoto).

La anemia falciforme se da en individuos que han heredado el alelo de esta enfermedad de ambos progenitores. Los eritrocitos de estos individuos son anormales y menos numerosos. Además de un número inusualmente elevado de células inmaduras, la sangre contiene muchos eritrocitos alargados, delgados y en forma de hoz **(Fig. 5-19)**. Cuando se desoxigena la hemoglobina de las células falciformes (llamada hemoglobina S), ésta pasa a ser insoluble y forma polímeros que se agregan en fibras tubulares **(Fig. 5-20)**. La hemoglobina normal (hemoglobina A) sigue siendo soluble cuando se desoxigena. Las fibras insolubles de la hemoglobina S desoxigenada son las responsables de la deformación en forma de hoz de los eritrocitos y la proporción de células falciformes aumenta en gran medida cuando se desoxigena la sangre.

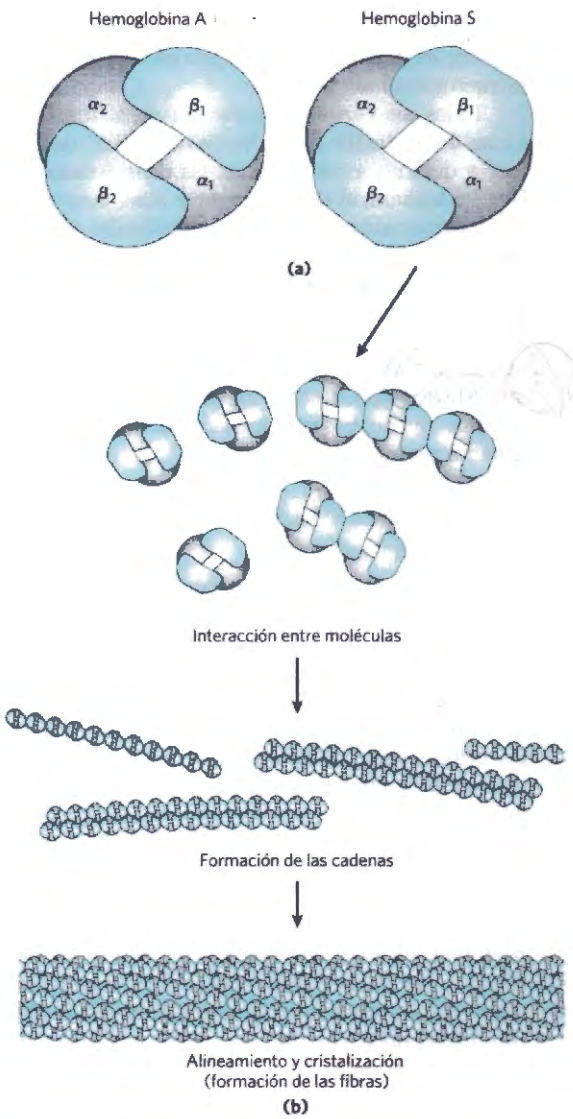


FIGURA 5-20 Hemoglobina normal y hemoglobina de la anemia falciforme. **(a)** Como resultado de un único cambio de aminoácido en las cadenas β se producen diferencias sutiles de conformación entre la hemoglobina A y la hemoglobina S. **(b)** A consecuencia de este cambio la desoxihemoglobina S presenta un parche hidrofóbico en su superficie, que provoca la agregación de las moléculas en cadenas que se alinean en forma de fibras insolubles.

Las propiedades alteradas de la hemoglobina S son el resultado de la sustitución de un único aminoácido, una Val en lugar de un residuo Glu en la posición 6 de las dos cadenas β. El grupo R de la valina no posee carga eléctrica, mientras que el glutamato tiene una carga negativa a pH 7,4. Por lo tanto la hemoglobina S tiene dos cargas negativas menos que la hemoglobina A, una por cada una de las cadenas β. La sustitución de Glu por Val crea un punto de contacto hidrofóbico "adhesivo" en la posición 6 de la cadena β, que se sitúa en la superficie exterior de la molécula. Estos puntos adhesivos hacen que las moléculas de desoxihemoglobina S se asocien anormalmente entre ellas, formando los largos agregados fibrosos característicos de esta enfermedad.

Como ya hemos visto, la anemia falciforme se presenta en individuos homocigotos en el alelo falciforme del gen codificante de la subunidad β de la hemoglobina. Los individuos que reciben el alelo falciforme de uno solo de sus progenitores y que, por tanto, son heterocigotos, sufren una enfermedad más leve llamada rasgo de la anemia falciforme; en estos casos sólo un 1 % de sus eritrocitos son falciformes en estado de desoxigenación. Estos individuos pueden tener una vida completamente normal si evitan el ejercicio vigoroso u otros esfuerzos sobre el sistema circulatorio.

La anemia falciforme es una enfermedad dolorosa y que puede ser mortal. Las personas con anemia falciforme sufren crisis recurrentes provocadas por el ejercicio físico. Se sienten débiles, tienen vértigo y les falta el aire, además de sufrir un aumento del pulso y soplos cardíacos. El contenido en hemoglobina de su sangre es sólo la mitad del normal, de 15 a 16 g/100mL, debido a que los eritrocitos falciformes son muy frágiles y se rompen con facilidad, lo que provoca una anemia ("falta de sangre"). Una consecuencia aún más grave es que los capilares quedan bloqueados por los eritrocitos alargados y con formas anormales, provocando un intenso dolor e interfiriendo con las funciones normales de los órganos, siendo ésta una de las causas principales que provocan la muerte temprana de muchas personas que padecen esta enfermedad.

Las personas con anemia falciforme suelen morir en su infancia si no reciben tratamiento médico. Sin embargo, el alelo de la anemia falciforme es sorprendentemente común en algunas partes de África. La investigación sobre la persistencia de un alelo con efectos negativos tan evidentes en los individuos homocigotos, llevó al descubrimiento de que este alelo aporta una pequeña pero importante resistencia a formas letales de la malaria en individuos heterocigotos. Los individuos heterocigóticos experimentan una enfermedad más leve denominada rasgo de la célula falciforme; sólo un 1% de sus eritrocitos adoptan la forma de hoz al desoxigenarse. Estosd individuos pueden vivir una vida totalmente

normal siempre que eviten el ejercicio vigoroso y otras tensiones sobre el sistema circulatorio. La selección natural ha dado como resultado una población de alelos en la que se compensan los efectos negativos del estado homocigoto con la resistencia a la malaria que aporta el estado heterocigoto. ■

RESUMEN 5.1 Unión reversible de una proteína a un ligando: proteínas de unión a oxígeno

■ La función proteica suele implicar interacciones con otras moléculas. Una molécula que se une a una proteína se denomina ligando y el sitio al que se une sitio de fijación de ligando. Las proteínas pueden experimentar cambios conformacionales cuando se une un ligando en un proceso que se llama encaje inducido. En una proteína con múltiples subunidades la unión de un ligando a una subunidad puede afectar la unión del ligando a otras subunidades. La unión de ligandos puede estar regulada.

■ La mioglobina contiene un grupo prostético hemo que une oxígeno. El hemo consiste en un único átomo de Fe^{2+} coordinado en un anillo de porfirina. El oxígeno se une reversiblemente a la mioglobina; esta unión simple reversible se puede describir mediante una constante de asociación K_a o una constante de disociación K_d. Para una proteína monomérica tal como la mioglobina, la fracción de sitios de fijación ocupados por ligando es una función hiperbólica de la concentración de ligando.

■ La hemoglobina adulta normal tiene cuatro subunidades que contienen grupos hemo, dos α y dos β, similares en estructura entre sí y con la mioglobina. La hemoglobina existe en dos estados estructurales interconvertibles, T y R. El estado T es el más estable en ausencia de oxígeno. La unión de oxígeno promueve la transición hacia el estado R.

■ La unión de oxígeno a la hemoglobina es al mismo tiempo alostérica y cooperativa. Al unirse O_2 a un sitio de fijación, la hemoglobina experimenta cambios conformacionales que afectan a los otros sitios de fijación, lo que constituye un ejemplo de comportamiento alostérico. Los cambios conformacionales entre los estados T y R, a través de interacciones subunidad-subunidad, dan lugar a una unión cooperativa; este comportamiento se describe mediante una curva sigmoidea y se analiza mediante la representación de Hill.

■ Se han propuesto dos modelos principales para explicar la unión cooperativa de ligandos a proteínas con múltiples subunidades: el modelo concertado y el modelo secuencial.

■ La hemoglobina también se une a H^+ y CO_2, lo que resulta en la formación de pares iónicos que estabilizan el estado T y hacen disminuir la afinidad de la hemoglobina por el O_2 (efecto Bohr). La unión del oxígeno a la hemoglobina está también modulada por el 2,3-bisfosfoglicerato, que se une y estabiliza el estado T.

■ La anemia falciforme es una enfermedad genética causada por la sustitución de un único aminoácido (Glu^6 por Val^6) en cada una de las cadenas β de la hemoglobina. El cambio genera la aparición de una zona hidrofóbica en la superficie de la hemoglobina que hace que las moléculas se agreguen en haces de fibras. En condiciones de homocigosis, esta enfermedad presenta graves complicaciones médicas.

5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos. El sistema inmune y las inmunoglobulinas

Hemos visto de que modo las conformaciones de las proteínas de unión a oxígeno afectan a y son afectadas por la unión de pequeños ligandos (O_2 o CO_2) al grupo hemo. Sin embargo, la mayoría de las interacciones proteína-ligando no implican un grupo prostético. En vez de esto, el sitio de fijación de ligando suele ser más a menudo como el de la hemoglobina para el BPG: una hendidura en la proteína recubierta de residuos aminoácidos dispuestos de tal manera que hacen que la interacción sea altamente específica. Una discriminación efectiva para los ligandos es la norma para los sitios de fijación, incluso cuando los ligandos tienes diferencias estructurales muy pequeñas.

Todos los vertebrados poseen un sistema inmune capaz de distinguir las moléculas "propias" de las "ajenas" y destruir a continuación las consideradas ajenas. De esta manera, el sistema inmune elimina virus, bacterias y otros patógenos, así como moléculas que puedan representar una amenaza para el organismo. Fisiológicamente, la **respuesta inmune** es un entramado complejo de interacciones entre muchas clases de proteínas, moléculas y tipos celulares. Cuando se trata de proteínas individuales, la respuesta inmune demuestra como un sistema bioquímico específico y extremadamente sensible puede basarse en la unión reversible entre ligandos y proteínas.

La respuesta inmune incluye un conjunto de células y proteínas especializadas

La acción inmune es llevada a cabo por una amplia gama de **leucocitos** (glóbulos blancos de la sangre) que incluyen a los **macrófagos** y **linfocitos,** originados todos ellos a partir de células madre no diferenciadas de la médula ósea. Los leucocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo y patrullar los tejidos. Cada una de las células sintetiza una o más proteínas capaces de reconocer y unirse a moléculas que podrían ser señal de una infección.

La respuesta inmune es el resultado de la acción de dos sistemas complementarios, el sistema inmune humoral y el celular. El **sistema inmune humoral** (del latín *humor*, "fluido") está dirigido contra infecciones bacterianas y virus extracelulares (los que se encuentran en los fluidos corporales), pero también puede responder a proteínas externas individuales. El **sistema inmune celular** destruye las células propias infectadas por virus, encargándose también de destruir algunos parásitos y tejidos ajenos.

En el centro de la respuesta inmune se encuentran unas proteínas solubles llamadas **anticuerpos** o **inmunoglobulinas**, normalmente abreviadas como **Ig**. Las inmunoglobulinas se unen a bacterias, virus o moléculas grandes identificadas como ajenas, marcándolas para su destrucción. Las inmunoglobulinas constituyen hasta un 20 % de las proteínas sanguíneas y son producidas por

TABLA 5-2 Algunos tipos de leucocitos asociados con el sistema inmune

Cell type	Function
Macrófagos	Ingestión de grandes partículas y células por fagocitosis
Linfocitos B (células B)	Producción y secreción de anticuerpos
Linfocitos T (células T)	
Células T citotóxicas (T_c) (asesinas)	Interaccionan con células infectadas a través de receptores de superficie de las células T
Células T auxiliares (*helper*) (T_H)	Interaccionan con macrófagos y secretan citoquinas (interleuquinas) que estimulan la proliferación de las células T_c, T_H y B.

los **linfocitos B** o **células B**, llamadas así debido a que completan su desarrollo en la médula ósea (en inglés "bone marrow").

Los agentes que conforman la base de la respuesta inmune celular son una clase de **linfocitos T** o **células T** (llamados así porque las últimas fases de su desarrollo tienen lugar en el *t*imo) llamadas **células T citotóxicas** (**células T_C**, también llamadas células T asesinas). En el reconocimiento de las células infectadas o de los parásitos iintervienen unas proteínas llamadas **receptores de las células T** que se encuentran en la superficie de las células T_C. Los receptores son proteínas que habitualmente se disponen en la superficie exterior de las células y se extienden a través de la membrana plasmática; reconocen y unen ligandos extracelulares, desencadenando una serie de cambios en el interior de la célula.

Además de las células T citotóxicas también encontramos las **células T helper (células T_H, células T cooperantes o auxiliares)**, cuya función es producir unas proteínas señalizadoras solubles llamadas citoquinas, entre las que se cuentan las interleuquinas. Las células T_H interaccionan con los macrófagos. Las células T_H participan sólo de manera indirecta en la destrucción de células infectadas y patógenos, estimulando la proliferación selectiva de las células T_C y B que pueden unirse a un antígeno concreto. Este proceso, llamado **selección clonal**, aumenta el número de células del sistema inmunitario capaces de responder a un patógeno dado. La importancia de las células T_H se aprecia claramente en el caso de la epidemia causada por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el virus causante del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Las células T_H son la diana primaria de la infección por VIH. La eliminación de estas células incapacita progresivamente a la totalidad del sistema inmune. En la tabla 5-2 se resumen las funciones de los diversos leucocitos del sistema inmune.

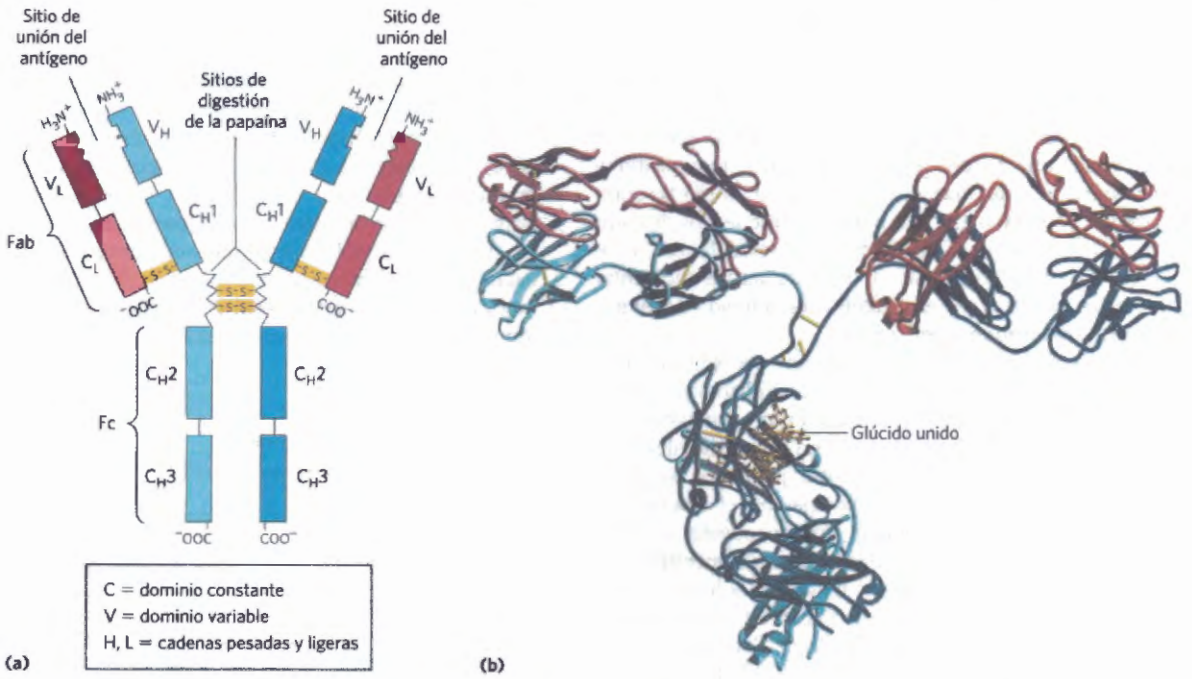


FIGURA 5-21 Inmunoglobulina G. **(a)** Pares de cadenas pesadas y ligeras se combinan para formar una molécula con forma de Y. Se crean dos sitios de fijación de antígeno por la combinación de los dominios variables de una cadena ligera (V_L) y de una pesada (V_H). La digestión con papaína separa las porciones Fab y Fc de la proteína por la región bisagra. La porción F_C de la molécula contiene también glúcido unido (se muestra en (b)). **(b)** Modelo de cintas de la primera molécula de IgG completamente cristalizada y analizada estructuralmente. A pesar de que la molécula contiene dos cadenas pesadas idénticas (en dos tonos de azul) y dos cadenas ligeras idénticas (en dos tonos de rojo), cristaliza según la conformación asimétrica mostrada. La flexibilidad conformacional puede ser importante para la función de las inmunoglobulinas. [Fuente: (b) PDB ID 1IGT, L. J. Harris et al., *Biochemistry* 36 :1581,1997.]

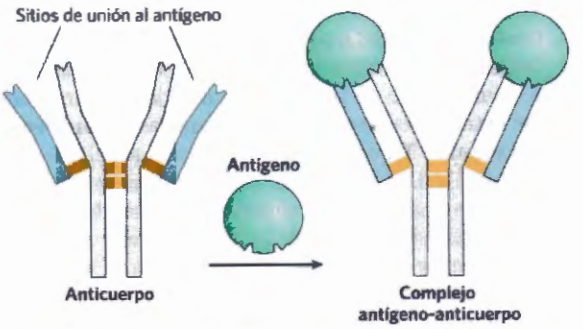


FIGURA 5-22 Unión de la IgG a un antígeno. Para generar un ajuste óptimo con el antígeno, los sitios de unión de la IgG suelen experimentar ligeros cambios de conformación. Un ajuste inducido de este tipo es típico de diversas interacciones entre proteína y ligando.

Cada proteína de reconocimiento del sistema inmune, ya sea un receptor de células T o un anticuerpo producido por una célula B, se une de manera específica a alguna estructura química concreta, distinguiéndola prácticamente de todas las demás. El ser humano es capaz de producir más de 10^8 anticuerpos diferentes con especificidad de unión propia. Dada esta extraordinaria diversidad, es altamente probable que cualquier estructura química de la superficie de un virus o de una célula invasora pueda ser reconocida y unirse a uno o más anticuerpos. La diversidad de los anticuerpos procede de la reorganización al azar de una serie de segmentos de los genes de las inmunoglobulinas mediante mecanismos de recombinación genética que se describirán en el Capítulo 25 (véase la Fig. 25-43).

Se utiliza un léxico especializado para describir las interacciones, exclusivas del sistema inmune, que se establecen entre anticuerpos o receptores de las células T y las moléculas a las que se unen. Se conoce como **antígeno** cualquier molécula o patógeno capaz de generar una respuesta inmune. Un antígeno puede ser un virus, una pared celular bacteriana, una proteína individual u otras macromoléculas. A un antígeno complejo se le pueden unir una serie de anticuerpos diferentes. Un anticuerpo o un receptor de las células T concreto se unirá solamente a una estructura molecular determinada dentro del antígeno denominada **determinante antigénico** o **epitopo.**

Responder a moléculas pequeñas que son intermediarios comunes y productos del metabolismo celular no sería productivo para el sistema inmune. Las moléculas con una M_r <5.000 generalmente no son antigénicas. No obstante, cuando estas moléculas pequeñas se unen covalentemente a grandes proteínas en el laboratorio, pueden usarse para originar una respuesta inmune. Estas moléculas pequeñas son llamadas **haptenos**. Los anticuerpos producidos como respuesta a los haptenos unidos a proteínas se unirán entonces a las mismas moléculas pequeñas en su forma libre. Este tipo de anticuerpos se emplea algunas veces en el desarrollo de pruebas analíticas que describimos más adelante en este capítulo o también como ligandos específicos en cromatografía de afinidad (véase la Fig. 3-17c). A continuación veremos una descripción más detallada de los anticuerpos y de sus propiedades de unión.

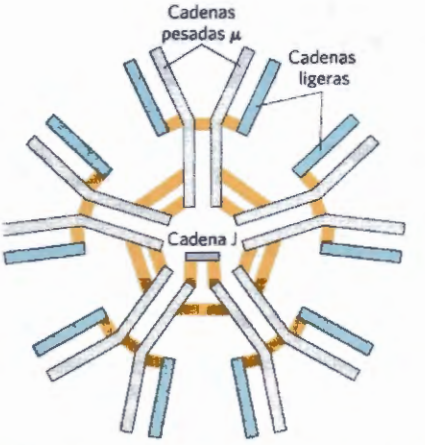


FIGURA 5-23 Pentámero IgM de unidades de inmunoglobulina. El pentámero está entrelazado con enlaces disulfuro (en amarillo). La cadena J es un polipéptido de M_r 20.000 encontrado tanto en la IgA como en la IgM.

Los anticuerpos poseen dos lugares idénticos de unión a antígeno

Las inmunoglobulinas G (IgG) son la principal clase de moléculas de anticuerpo y unas de las proteínas más abundantes en el suero sanguíneo. Las IgG tienen cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas largas, llamadas cadenas pesadas, y dos cadenas ligeras, unidas por enlaces no covalentes y puentes disulfuro que forman un complejo de M_r 150.000. Las cadenas pesadas de una molécula de IgG interaccionan en un extremo y a continuación se abren para interaccionar separadamente con las cadenas ligeras, formando una molécula en forma de Y **(Fig. 5-21)**. En las "bisagras" que separan la base de la IgG de sus ramas, la inmunoglobulina puede ser cortada por proteasas. La rotura con la proteasa papaína libera el fragmento basal, llamado **Fc** debido a que suele cristalizar fácilmente, y las dos ramas, conocidas como **Fab**, los fragmentos de unión a antígeno ("*a*ntigen-*b*inding"). Cada rama tiene un único sitio de fijación de antígeno.

La estructura básica de las inmunoglobulinas fue establecida por primera vez por Gerald Edelman y Rodney Porter. Cada cadena está compuesta por dominios identificables: algunos son constantes en secuencia y

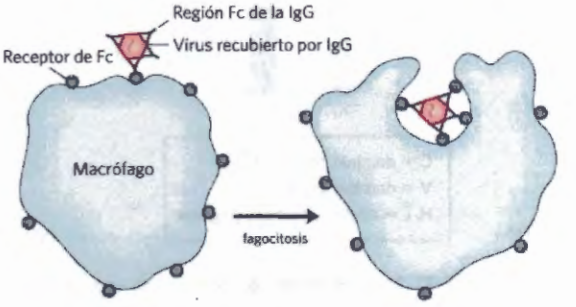
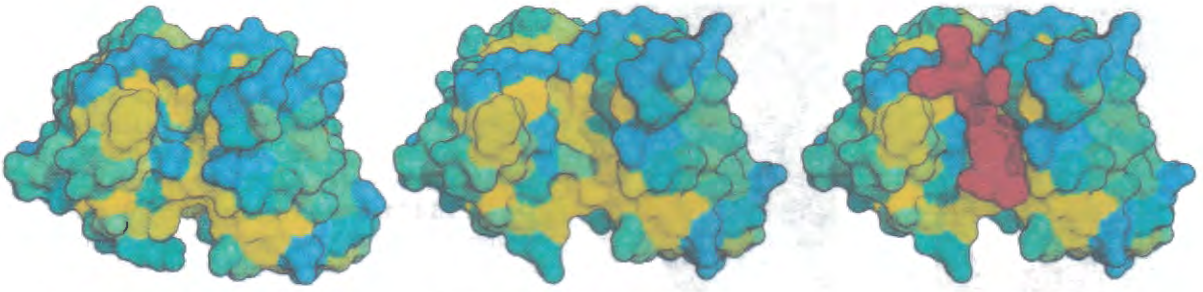


FIGURA 5-24 Fagocitosis por un macrófago de un virus unido a anticuerpo. Las regiones F_c de los anticuerpos unidas a los virus se unen a receptores de F_c situados en la superficie del macrófago, haciendo que el macrófago fagocite al virus y lo destruya.



(a) Conformación sin antígeno unido **(b)** Antígeno unido (pero no mostrado) **(c)** Antígeno unido (mostrado)

FIGURA 5-25 Encaje inducido en la unión de un antígeno a la IgG. La molécula, mostrada en un contorno de superficie se ha coloreado para mostrar la hidrofobicidad. Las superficies hidrofóbicas están en amarillo, las superficies hidrofílicas en azul con matices desde azul a verde con amnarillo entre medio **(a)** Vista del fragmento Fab en ausencia de antígeno (un péptido pequeño procedente de VIH) mirando hacia el sitio de fijación de antígeno. **(b)** La misma perspectiva, pero aquí el fragmento Fab está en la conformación de "unión"; el antígeno no está representado para permitir una visión sin impedimentos del sitio de fijación alterado. Observe que la cavidad de unión se ha agrandado y varios grupos han cambiado de posición. **(c)** La misma perspectiva que en (b), pero con el antígeno representado en el sitio de fijación como una estructura roja de varillas. [Fuentes: (a) PDB ID 1GGC, R. L. Stanfield et al.,*Structure* 1:83, 1993. (b) PDB ID 1GGI, J- M. Rini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6325, 1993.]

estructura de una IgG a otra; otros son variables. Los dominios constantes tienen una estructura característica conocida como el **plegamiento de la inmunoglobulina**, un motivo estructural muy conservado en todas las proteínas de la clase β (Capítulo 4). Hay tres de estos dominios constantes en cada cadena pesada y uno en cada cadena ligera. Las cadenas pesada y ligera poseen además un dominio variable cada una, en el cual se encuentra la mayor parte de la variabilidad en la secuencia de aminoácidos. Los dominios variables se asocian para crear el sitio de fijación del antígeno (Fig. 5-21), que permite la formación de un complejo antígeno-anticuerpo **(Fig. 5-22)**.

En muchos vertebrados las IgG son solamente una de las cinco clases de inmunoglobulinas. Cada clase tiene un tipo característico de cadena pesada, llamadas α, δ, ε, γ y μ, que corresponden a las IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Hay dos tipos de cadena ligera, κ y λ, que están presentes en todas las clases de inmunoglobulinas. Las estructuras globales de las **IgD** y las **IgE** son similares a la de las IgG. Las **IgM** pueden presentarse en forma monomérica, unidas a membrana, o en forma de pentámero entrecruzado de la estructura básica cuando son secretadas **(Fig. 5-23)**. Las **IgA** se encuentran principalmente en secreciones como la saliva, las lágrimas y la leche, pudiendo encontrarse como monómeros, dímeros o trímeros. Las IgM son los primeros anticuerpos producidos por los linfocitos B y el principal anticuerpo en los primeros estadios de la respuesta inmune primaria. Algunas células B empiezan también pronto a producir IgD (con el mismo sitio de fijación de antígeno que la IgM producida por la misma célula) pero la función específica de las IgD no está bien definida.

La IgG descrita anteriormente es el principal anticuerpo en la respuesta inmune secundaria, la respuesta iniciada por una clase de células B denominadas células B de memoria. Como parte de la inmunidad del organismo frente a antígenos ya conocidos, la IgG es la inmunoglobulina más abundante en la sangre. Cuando la IgG se une a una bacteria invasora o a un virus, activa ciertos leucocitos, como los macrófagos, para que engullan y destruyan al invasor, y también activa otros componentes de la respuesta inmune. Unos receptores de la superficie celular de los macrófagos reconocen y unen la región Fc de las IgG. Cuando estos receptores de Fc se unen a un complejo anticuerpo-patógeno el macrófago lo rodea y lo incorpora por fagocitosis **(Fig. 5-24)**.

La IgE juega un papel muy importante en la respuesta alérgica, interaccionando con los basófilos (leucocitos fagocíticos) en la sangre y con las células secretoras de histamina llamadas mastocitos que están ampliamente distribuidas por los tejidos. Esta inmunoglobulina se une por su región Fc a receptores Fc específicos de los basófilos o de los mastocitos. De esta manera, la IgE actúa como una especie de receptor del antígeno. La unión del antígeno induce la secreción por parte de las células de histamina y otras aminas biológicamente activas que provocan dilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Se cree que estos efectos sobre los vasos sanguíneos sirven par facilitar el desplazamiento de las células y proteínas del sistema inmune hacia los lugares de inflamación. También provocan los síntomas normalmente asociados con las alergias. El polen y otros alergenos son reconocidos como extraños, desencadenando una respuesta del sistema inmune que, normalmente, se reserva para los patógenos. ■

Los anticuerpos se unen fuertemente y de manera específica al antígeno

La especificidad de unión de un anticuerpo viene determinada por los residuos aminoácidos de los dominios variables de sus cadenas pesada y ligera. Muchos residuos de estos dominios son variables, aunque no en la misma medida. Algunos, principalmente aquellos que recubren el sitio de fijación del antígeno, son hipervariables (especialmente proclives a la variación). La especificidad se debe a la complementariedad química entre el antígeno y su sitio de fijación específico, en términos de forma y localización de grupos cargados, apolares y formadores de puentes de hidrógeno. Por ejemplo, un sitio de fijación con un grupo cargado negativamente puede unir un antígeno con una carga positiva en la posición complementaria. En muchos casos, la complementariedad se consigue de modo interactivo gracias a que las estructuras del antígeno y del sitio de fijación se influyen mutuamente durante la aproximación del ligando. A continuación, cambios conformacionales en



Georges Köhler, 1946–1995
[Fuente: Bettman/Corbis.]



Cesar Milstein, 1927–2002
[Fuente: Corbin O'Grady Studio/ Science Source.]

el anticuerpo y/o en el antígeno permiten una completa interacción entre grupos complementarios. Éste es un ejemplo de encaje inducido. El complejo de un péptido derivado del VIH (un antígeno modelo) y una molécula Fab mostrada en la **Figura 5-25** ilustra algunas de estas propiedades. En este caso los cambios en la estructura observados al unirse el antígeno son muy llamativos.

Una interacción antígeno-anticuerpo típica es bastante fuerte, caracterizándose por valores de K_d tan bajos como 10^{-10} M (recuérdese que una K_d más baja corresponde a una interacción de unión más fuerte; véase la Tabla 5-1). La K_d refleja la energía derivada de las diversas interacciones iónicas, de enlace de hidrógeno, hidrofóbicas y de van der Waals que estabilizan la unión. La energía de unión necesaria para generar una K_d de 10^{-10} M es de unos 65 kJ/mol.

Las interacciones antígeno-anticuerpo son la base de diversos procesos analíticos importantes

La extraordinaria afinidad y especificidad de unión de los anticuerpos los convierten en valiosos reactivos para análisis. Se emplean dos tipos de anticuerpos: los policlonales y los monoclonales. Los **anticuerpos policlonales** son los producidos por muchos linfocitos B diferentes en respuesta a un antígeno, como podría ser el caso de una proteína inyectada a un animal. Las células de la población de linfocitos B producen anticuerpos que unen específicamente diferentes epitopos dentro del antígeno. Por lo tanto, una preparación policlonal contiene una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes partes de una proteína. Por el contrario, los **anticuerpos monoclonales** se sintetizan por una población de células B idénticas (un **clon**) crecidas en cultivo celular. Estos anticuerpos son homogéneos por lo que todos reconocen el mismo epitopo. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales fueron desarrolladas por George Köhler y Cesar Milstein.

La especificidad de los anticuerpos tiene utilidades prácticas. Un anticuerpo seleccionado puede unirse covalentemente a una resina y utilizarse en una columna de cromatografía del tipo que se muestra en la figura 3-17c. Cuando se añade una mezcla de proteínas a la columna, el anticuerpo unirá específicamente su proteína diana y la retendrá en la columna mientras que las otras proteínas escaparán de ella. La proteína diana puede entonces eluirse de la resina utilizando una solución salina o algún otro agente. Ésta es una herramienta muy poderosa para la purificación de proteínas.

En otra técnica analítica muy versátil, un anticuerpo puede marcarse radiactivamente o con algún otro reactivo que lo haga fácil de detectar. Cuando el anticuerpo se une a la proteína diana, la marca revela la presencia de la proteína en una solución o su localización en un gel o incluso en una célula viva. En la **Figura 5-26** se ilustran algunas variantes de este procedimiento.

Un **ELISA** (*e*nzyme-*l*inked *i*mmunosorbent *a*ssay: análisis del inmunoadsorbente unido a enzima) permite un rastreo rápido y una cuantificación de la presencia de un antígeno en una muestra (Fig. 5-26b). Las proteínas de una muestra se adsorben sobre una superficie inerte, normalmente una placa de poliestireno de 96 pocillos. La superficie se lava con una disolución de una proteína no específica y barata (normalmente caseína de leche descremada en polvo) para bloquear los sitios no ocupados evitando que otras proteínas se unan a ellos en los pasos siguientes. A continuación la superficie se trata con una solución que contenga el anticuerpo primario, un anticuerpo contra la proteína de interés. Se lava el anticuerpo no unido y la superficie se trata con una disolución que contiene un anticuerpo secundario (anticuerpo contra el anticuerpo primario), conjugado a un enzima que cataliza una reacción que da lugar a la formación de un producto coloreado. Después de la eliminación del anticuerpo secundario no unido se añade el sustrato del enzima conjugado. La formación de producto (medida colorimétricamente) es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la muestra.

En un **ensayo de inmunoblot,** o **inmunotransferencia** también llamado **transferencia Western** (Fig. 5-26c), las proteínas que se han separado mediante electroforesis en gel se transfieren electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea (de la misma manera que se hace en un ELISA) y a continuación se trata sucesivamente con el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario conjugado con el enzima y el sustrato. Se forma un precipitado coloreado únicamente sobre la banda que contiene la proteína de interés. La inmunotransferencia permite la detección de componentes minoritarios de una muestra y proporciona una aproximación de su masa molecular.

Encontraremos otros aspectos de los anticuerpos en capítulos posteriores. Son extremadamente importantes en medicina y nos pueden enseñar muchas cosas sobre la estructura de las proteínas y la acción de los genes.

RESUMEN 5.2 Interacciones complementarias entre proteínas y ligandos: el sistema inmune y las inmunoglobulinas

- La respuesta inmune está mediada por interacciones entre un conjunto de leucocitos especializados y sus proteínas asociadas. Los linfocitos T producen receptores de células T. Los linfocitos B producen inmunoglobulinas. Mediante un proceso denominado selección clonal, las células T auxiliares (*helper*) inducen la proliferación de células B y de células T citotóxicas que producen inmunoglobulinas o de receptores de células T que se unen a un antígeno específico.
- El ser humano posee cinco clases de inmunoglobulinas, con diferentes funciones biológicas para cada una de ellas. La clase más abundante es las de las IgG, proteínas en forma de Y con dos cadenas pesadas y dos

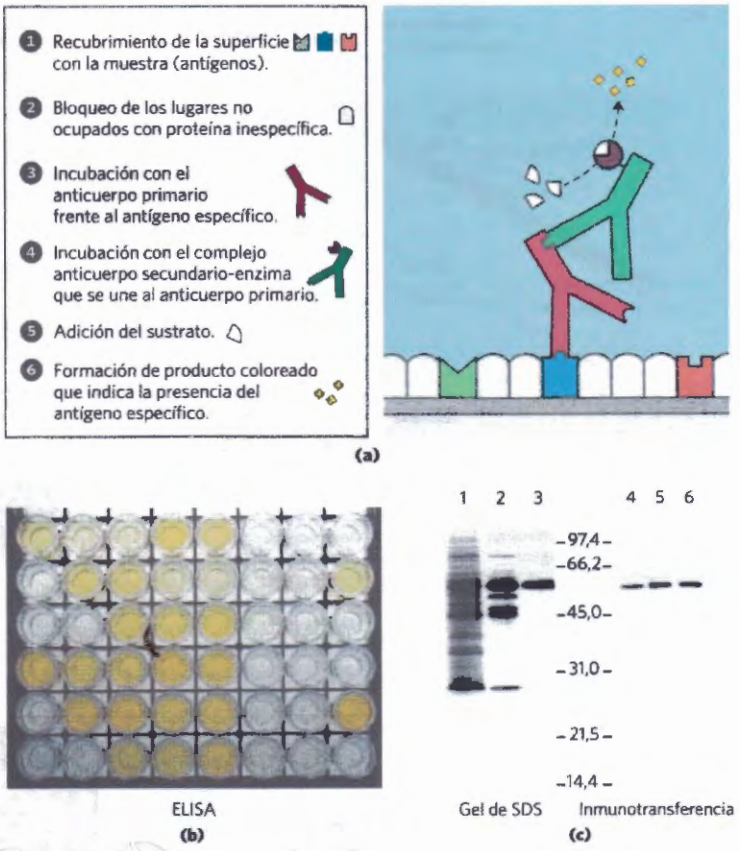


FIGURA 5-26 Técnicas con anticuerpos. La reacción específica de un anticuerpo con su antígeno es la base de diversas técnicas que identifican y cuantifican proteínas específicas en muestras complejas. **(a)** Representación esquemática del método general. **(b)** Un ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos frente al virus herpes simplex (VHS) en muestras de sangre. Los pocillos se recubrieron con un antígeno VHS al cual se le unirán los anticuerpos contra el VHS. El segundo anticuerpo es una anti IgG humana unida a la peroxidasa de rábano. Al terminar los pasos mostrados en (a), las muestras de sangre con mayor cantidad de anticuerpos frente al VHS dan un color amarillo más intenso. **(c)** Una inmunotransferencia. Los carriles del 1 al 3 pertenecen a un gel de SDS; muestras pertenecientes a pasos consecutivos de la purificación de una proteína quinasa se han resuelto electroforéticamente y teñido con azul de Coomasie. Los carriles del 4 al 6 presentan las mismas muestras después de haber sido transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, tras separación en un gel de SDS. A continuación, la membrana se "analizó" con un anticuerpo frente a la proteína quinasa. Los números entre el gel y la inmunotransferncia indican el M_r (en millares). [Fuentes: (b, c) State of Wisconsin Lab of Hygiene, Madison, WI.]

ligeras. Los dominios cercanos a los extremos superiores de la Y son hipervariables dentro de la amplia población de las IgG y forman dos sitios de fijación de antígeno.

- Una inmunoglobulina determinada se une generalmente a una única parte, denominada epitopo, de un antígeno más grande. La unión suele implicar un cambio conformacional de la IgG a través de un encaje inducido con el antígeno.
- Se aprovecha la gran especificidad de las inmunoglobulinas en técnicas analíticas tales como el ELISA y la inmunotransferencia.

5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

Los organismos se mueven. Las células se mueven. Los orgánulos y las macromoléculas dentro de las células se mueven. La mayoría de estos movimientos se originan a partir de la actividad de unos fascinantes motores moleculares basados en proteínas. Grandes agregados de proteínas motoras experimentan cambios conformacionales cíclicos que se acumulan en fuerzas direccionales unificadas, para lo que utilizan energía química, normalmente procedente del ATP. La fuerza resultante puede ser pequeña, como la responsable de la separación de los cromosomas en la división celular, o inmensa, como la que eleva en el aire a un tigre de un cuarto de tonelada de peso.

Tal como se puede suponer, las interacciones entre las proteínas motoras muestran interacciones específicas de grupos iónicos, enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos. Sin embargo, en las proteínas motoras estas interacciones alcanzan niveles extraordinariamente altos de organización espacial y temporal.

Las proteínas motoras son la base de la migración de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos, la rotación de los flagelos eucarióticos y bacterianos y el movimiento de algunas proteínas a lo largo del DNA así como de la contracción muscular. Las proteínas llamadas quinesinas y dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos en las células, transportando orgánulos o reorganizando los cromosomas durante la división celular. Es una interacción de la dineína con los microtúbulos la que origina el movimiento de los flagelos y los cilios de los eucariotas. En ell movimiento flagelar de las bacterias interviene un complicado motor de rotación situado en la base del flagelo (véase la Fig. 19-41). Las helicasas, las polimerasas, y otras proteínas se mueven a lo largo del DNA al tiempo que llevan a cabo sus funciones metabólicas sobre el DNA (Capítulo 25). Aquí, nos centraremos en el bien estudiado ejemplo de las proteínas contráctiles del músculo esquelético de los vertebrados, utilizándolo como paradigma de la forma en que las proteínas transforman energía química en movimiento.

Las principales proteínas del músculo son la miosina y la actina

La fuerza para la contracción muscular se genera por la interacción de dos proteínas, la miosina y la actina. Estas proteínas están dispuestas en filamentos que llevan a cabo interacciones transitorias y que se deslizan

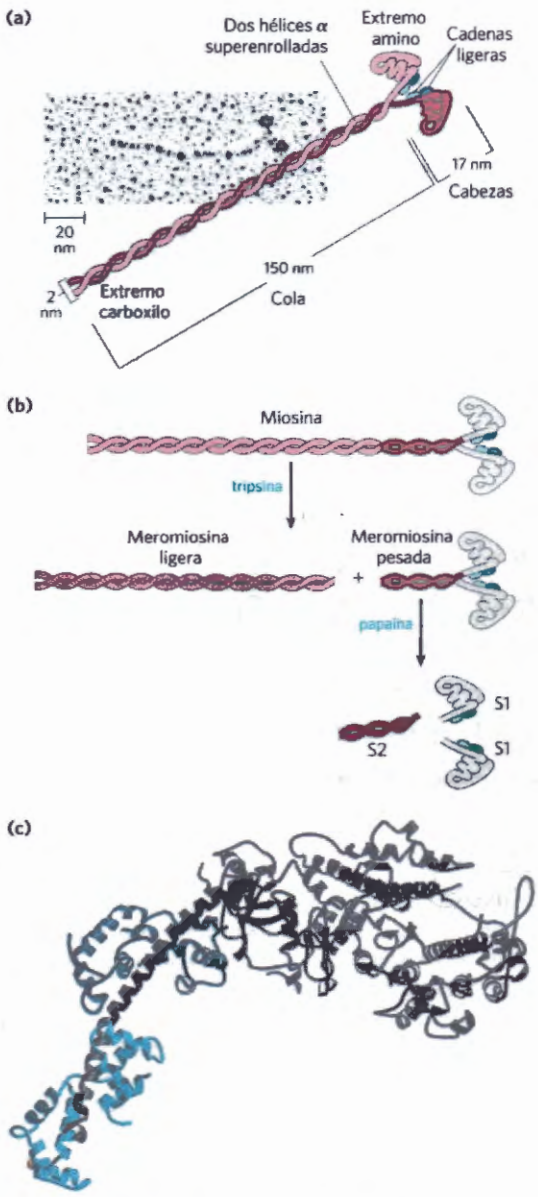


FIGURA 5-27 Miosina. **(a)** La miosina tiene dos cadenas pesadas (coloreadas en dos tonos de rojo), en las que el extremo carboxilo forma un superenrollamiento extendido (cola) y el extremo amino-terminal tiene unos dominios globulares (cabezas). Con cada cabeza de miosina hay dos cadenas ligeras asociadas (en azul). **(b)** La digestión con tripsina y papaína separa las cabezas de miosina (fragmentos S1) de las colas (fragmentos S2). **(c)** Representación de cintas del fragmento S1 de la miosina (a partir de coordenadas cedidas por Ivan Rayment.). La cadena pesada se muestra en gris, las dos cadenas ligeras se muestran en dos tonos de azul. [Fuentes: (a) Takeshi Katayama et al., "Stimulatory effects of arachidonic acid on myosin ATPase activity and contraction of smooth muscle via myosin motor domain" *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* Vol. 298, Issue 2, pp. H505-H514, February 2010, Fig. 6B. (c) Cortesía de Ivan Rayment, University of Wisconsin Madison, Enzyme Institute and Department of Biochemistry, PDB ID 2MYS, I. Rayment et al., *Science* 261:150, 1993.]

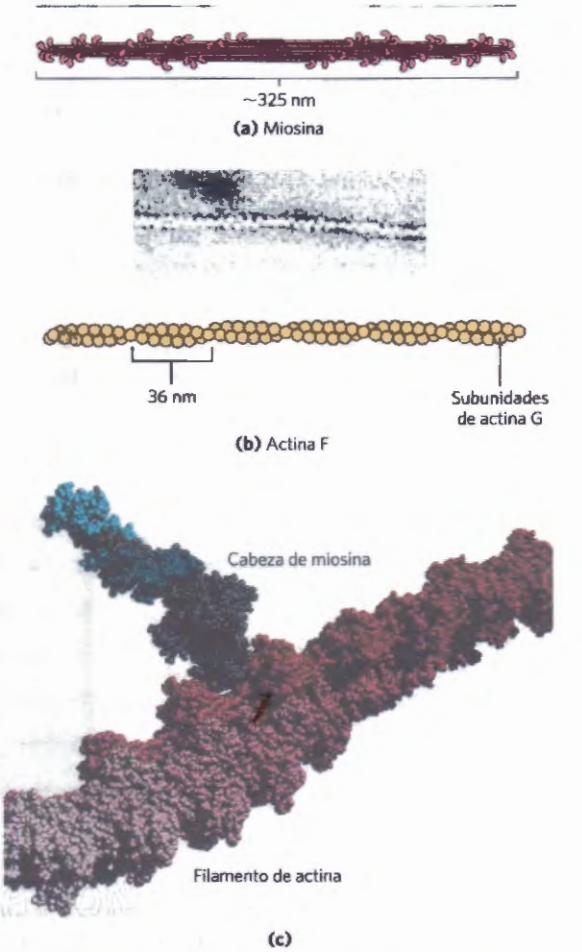


FIGURA 5-28 Principales componentes del músculo. **(a)** Los agregados de miosina forman una estructura bipolar conocida como filamento grueso. **(b)** La actina F ensamblajes una formación filamentosa de los monómeros de actina G, que polimerizan en parejas adquiriendo el aspecto de dos filamentos que se enrollan en espiral uno sobre otro con una orientación dextrógira. **(c)** Modelo espacial de esferas de un filamento de actina (diferentes tonos de rojo) con una cabeza de miosina (en gris y dos tonos de azul) unida a un monómero de actina dentro del filamento [Fuentes: (b) Dr. Roger W. Craig, University of Massachusetts Medical School. (c) Cortesía de Ivan Rayment, University of Wisconsin-Madison, Enzyme Institute and Department of Biochemistry; PDB ID 2MYS, I Rayment et al., *Science* 261:50, 1993.]

unos sobre otros para realizar la contracción. En conjunto la actina y la miosina conforman el 80% de la masa proteica muscular.

La **miosina** (M_r 520.000) tiene seis subunidades: dos cadenas pesadas (cada una con M_r 220.000) y cuatro cadenas ligeras (cada una con M_r 20.000). Las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la estructura global. Se hallan dispuestas como hélices α extendidas en su extremo carboxilo-terminal, dispuestas unas sobre las otras con un superenrollamiento levógiro formando una fibra del tipo de la α-queratina **(Fig. 5-27a)**. En su extremo amino-terminal cada cadena pesada tiene un gran dominio globular donde se encuentra el sitio de hidrólisis del ATP. Las cadenas ligeras están asociadas con los dominios globulares. Tras un breve tratamiento de la miosina con la proteasa tripsina,

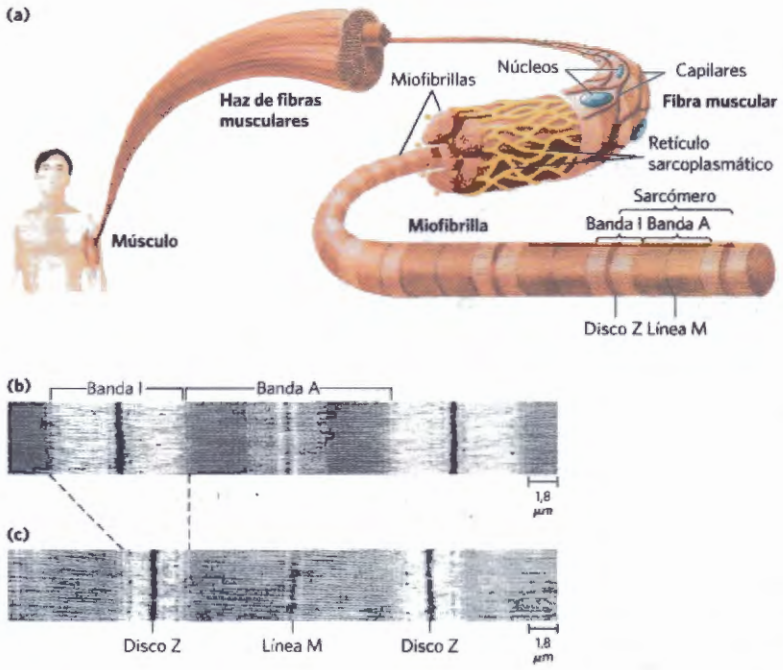


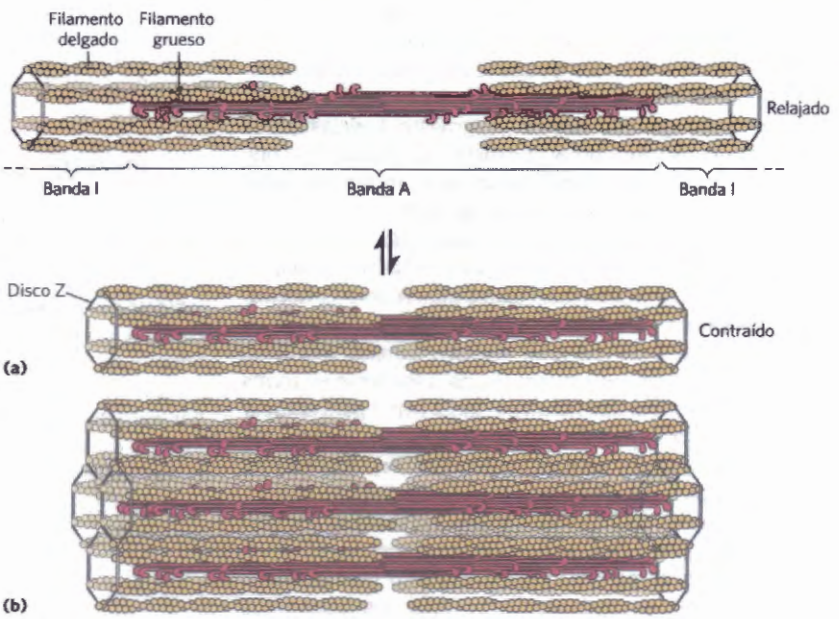
FIGURA 5-29 Músculo esquelético. **(a)** Las fibras musculares están formadas por células multinucleadas alargadas que se originan por la fusión de muchas células precursoras. Dentro de las fibras hay muchas miofibrillas (aquí se muestran sólo seis para una mayor claridad), que están rodeadas por el retículo sarcoplasmático membranoso. La organización de los filamentos gruesos y delgados dentro de la miofibrilla le confiere una apariencia estriada. Cuando el músculo se contrae las bandas I se estrechan y los discos Z se acercan entre sí, como puede observarse en las micrografías electrónicas del músculo relajado **(b)** y contraído **(c)**. [Fuente: (b,c) James E. Dennis/Phototake.]

se corta la mayor parte de la cola fibrosa y se divide la proteína en dos componentes llamados meromiosina ligera y pesada (Fig. 5-27b). El dominio globular, llamado subfragmento 1 o S1 de la miosina, o simplemente "cabeza" de la miosina, se puede liberar de la meromiosina pesada por tratamiento con papaína dando lugar al subfragmento 2 de la miosina o S2. El fragmento S1 es el dominio motor que permite la contracción muscular. Los fragmentos S1 pueden cristalizarse y su estructura global se muestra, tal como fue determinada por Ivan Rayment y Hazel Holden, en la Figura 5-27c.

En las células musculares, las moléculas de miosina se agregan para formar las estructuras llamadas **filamentos gruesos (Fig. 5-28a)**. Estas estructuras en forma de varilla actúan como núcleo de la unidad contráctil. Varios centenares de moléculas de miosina se disponen en un filamento grueso con sus "colas" fibrosas asociadas para formar una larga estructura bipolar. Los dominios globulares se proyectan a partir de cualquiera de los dos extremos de esta estructura a modo de grupos apilados de forma regular.

La segunda de las proteínas principales del músculo, la **actina**, abunda en casoi todas las células eucariotas. En el músculo, las moléculas de actina monomérica llamada actina G (actina *g*lobular: M_r 42.000), se asocian para formar largos polímeros llamados actina F (actina *f*ilamentosa). Los **filamentos delgados** (Fig. 5-28b) están formadas por actina F junto con las proteínas

FIGURA 5-30 Contracción muscular. Los filamentos gruesos son estructuras bipolares creadas por la asociación de muchas moléculas de miosina. **(a)** La contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos gruesos y delgados entre ellos de manera que los discos Z de bandas I vecinas se aproximan entre sí. **(b)** Los filamentos gruesos y delgados se disponen de manera que cada filamento grueso está rodeado por seis filamentos delgados.



troponina y tropomiosina (que se describen más adelante). Las partes filamentosas de los filamentos delgados se asocian al añadirse sucesivas moléculas de actina monomérica a un extremo. Además, cada monómero une ATP y a continuación lo hidroliza a ADP, de manera que todas las moléculas de actina del filamento forman complejos con ADP. Esta hidrólisis de ATP por la actina se produce sólo en la formación de los filamentos; no contribuye directamente a la energía gastada en la contracción muscular. Cada monómero de actina del filamento delgado puede unirse fuertemente y de manera específica a una cabeza de miosina (Fig. 5-28c).

Otras proteínas adicionales organizan los filamentos delgado y grueso para dar estructuras ordenadas

El músculo esquelético consiste en haces paralelos de **fibras musculares**, siendo cada fibra una única célula multinucleada de gran tamaño, de 20 a 100 μm de diámetro, formada a partir de la fusión de muchas células y con una longitud a veces igual a la del propio músculo. Cada fibra contiene unas 1.000 **miofibrillas**, de 2 μm de diámetro, estando formada cada una por un gran número de filamentos delgados y gruesos en complejo con otras proteínas y dispuestos de manera regular **(Fig. 5-29)**. Un sistema de vesículas membranosas planas llamado **retículo sarcoplasmático** rodea cada miofibrilla. Al examinarse al microscopio electrónico, las fibras musculares muestran regiones alternas de alta y baja densidad electrónica, llamadas **bandas A** y **bandas I** (Fig. 5-29b, c). Las bandas A e I se deben a la disposición de los filamentos gruesos y delgados, que están alineados y parcialmente solapados. La banda I es la región del haz cuyo corte transversal sólo contendría filamentos delgados. La banda A, más oscura, es igual de larga que los filamentos gruesos e incluye la región de solapamiento entre filamentos gruesos y delgados paralelos. La banda I está biseccionada por una fina estructura llamada **disco Z**, perpendicular a los filamentos delgados y que actúa como un ancla a la cual se unen estos filamentos. La banda A también está biseccionada por una línea fina, la **línea M** o disco M, que es una región de alta densidad electrónica en el centro de los filamentos gruesos. El conjunto de la unidad contráctil, los haces de filamentos gruesos solapados en cada uno de sus extremos con haces de filamentos delgados, se denomina **sarcómero**. La disposición de los haces yuxtapuestos permite que los filamentos gruesos y delgados se deslicen unos sobre otros (mediante un mecanismo que discutiremos más adelante), provocando un acortamiento progresivo de cada sarcómero **(Fig. 5-30)**.

Los filamentos delgados de actina están unidos en un extremo al disco Z siguiendo un patrón regular. El conjunto incluye las proteínas musculares minoritarias **α-actinina, desmina** y **vimentina**. Los filamentos delgados también contienen una gran proteína llamada **nebulina** (~7.000 aminoácidos), la cual podría disponerse en forma de una hélice α suficientemente larga como para abarcar toda la longitud del filamento. La línea M organiza los filamentos gruesos de una manera similar. Contiene las proteínas **paramiosina, proteína C** y **proteína M.** Otra clase de proteínas llamadas **titinas,** las cadenas polipeptídicas simples más largas que se conocen hasta el momento (la titina del músculo cardíaco humano tiene 26.926 residuos aminoácidos), unen los filamentos

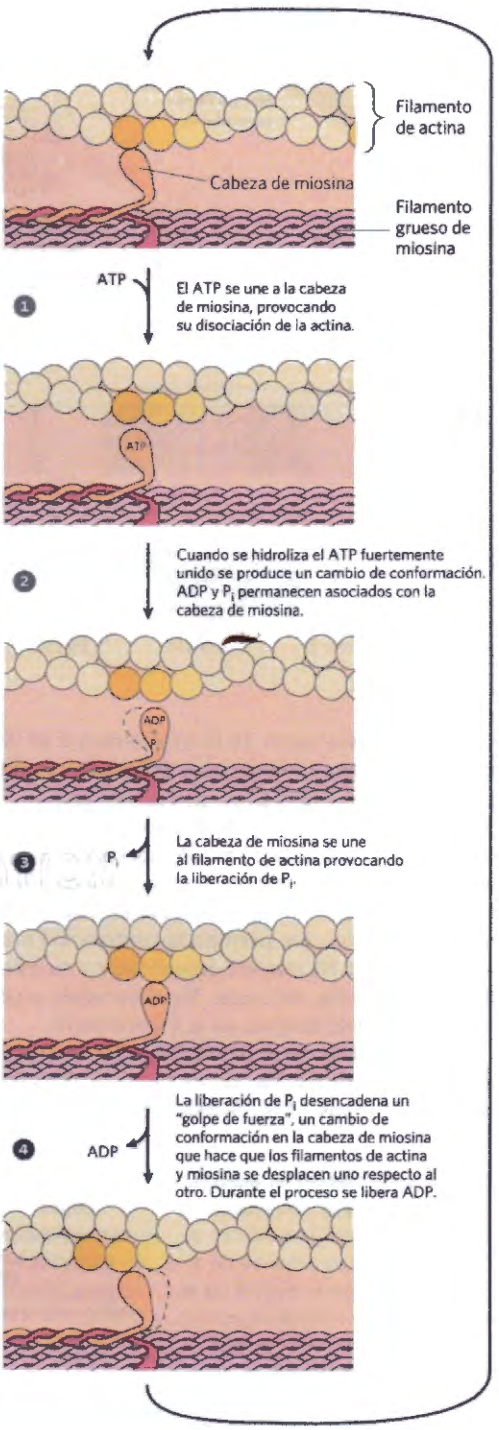


FIGURA 5-31 Mecanismo molecular de la contracción muscular. Una serie de cambios de conformación en la cabeza de miosina, acoplados a fases del ciclo hidrolítico del ATP, hacen que la miosina se disocie sucesivamente de una subunidad de actina y a continuación se asocie a otra más alejada del filamento de actina. De esta manera las cabezas de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados, arrastrando a los filamentos gruesos dentro del entramado de filamentos delgados (véase la Fig. 5-30).

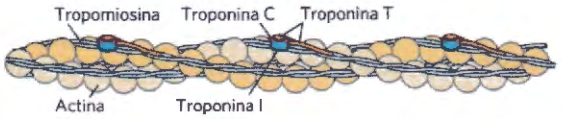


FIGURA 5-32 Regulación de la contracción muscular por la tropomiosina y la troponina. La tropomiosina y la troponina están unidas a la actina F en los filamentos delgados. En el músculo relajado, estas dos proteínas están dispuestas alrededor de los filamentos de actina de manera que bloquean los sitios de unión para la miosina. La tropomiosina es una superhélice de dos cadenas de hélice α, la misma estructura que la de la α-queratina (véase la Fig. 4-11). Forma polímeros cabeza-cola que se doblan alrededor de las dos cadenas de actina. La troponina se une al complejo actina-tropomiosina a intervalos regulares de 38,5 nm. La troponina está formada por tres subunidades difrentes: I, C y T. La troponina I impide la unión de la cabeza de miosina a la actina; la troponina C tiene un sitio de unión de Ca^{2+} y la troponina T une el complejo entero de troponina a la tropomiosina. Cuando el músculo recibe una señal nerviosa para iniciar la contracción, se libera Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (véase la Fig. 5-29a) y se une a la troponina C. Esto produce un cambio de conformación en la troponina C que altera las posiciones de la troponina I y de la tropomiosina de manera que se libera la inhibición por la troponina I y se permite la contracción muscular.

gruesos al disco Z, lo que proporciona un nivel adicional de organización a la estructura global. Se cree que, entre sus funciones estructurales, tanto la nebulina como la titina actúan como "reglas moleculares", ue regulan la longitud de los filamentos gruesos y delgados, respectivamente. La titina se extiende del disco Z a la línea M, regulando la longitud del sarcómero y evitando una hiperextensión del músculo. En los vertebrados la longitud característica de un sarcómero varía de un tejido muscular a otro, un fenómeno atribuible en gran medida a la presencia de diferentes variantes de titina en los tejidos.

Los filamentos gruesos de miosina se deslizan a lo largo de los filamentos delgados de actina

La interacción entre la actina y la miosina, igual que cualquier otra entre proteínas y ligandos, está basada en enlaces débiles. Cuando no hay ATP unido a la miosina, una cara del grupo de cabeza de ésta se une fuertemente a la actina **(Fig. 5-31)**. Cuando el ATP se une a la miosina y se hidroliza a ADP y fosfato, se produce una serie de cambios de conformación coordinados mediante los cuales la miosina libera la subunidad F de la actina y se une a otra subunidad en una posición más alejada del filamento delgado.

El ciclo consta de cuatro pasos principales (Fig. 5-31). En el paso ❶, el ATP se une a la miosina se abre una hendidura en la molécula de miosina, a consecuencia de lo cual se deshace la interacción actina-miosina, liberándose la actina. A continuación el ATP se hidroliza en el paso ❷, provocando un cambio conformacional en la proteína, que pasa a un estado de "alta energía" que hace que la cabeza de miosina se mueva y cambie su orientación con respecto al filamento delgado de actina. La miosina se une, entonces, débilmente a una subunidad de actina F más cercana al disco Z que la que acaba de liberar. En el paso ❸ se produce otro cambio conformacional cuando el fosfato, producto de la hidrólisis del ATP, es liberado de la miosina. Este cambio consiste en el cierre de la hendidura de la miosina que fortalece la unión actina-miosina. Inmediatamente a continuación se produce el paso ❹, un "golpe de energía" en el que la conformación de la cabeza de miosina vuelve a su estado de reposo original, con un cambio en su orientación relativa con respecto a la actina unida que hace que la cola de la miosina se aproxime al disco Z. A continuación se libera ADP para completar el ciclo. Cada ciclo genera entre 3 y 4 pN (piconewtons) de fuerza y mueve el filamento grueso de 5 a 10 nm con respecto al filamento delgado.

Debido al gran número de cabezas de miosina presentes en un filamento grueso, en cualquier momento habrá algunas de ellas (probablemente entre el 1% y el 3%) unidas a filamentos delgados. Esto evita que los filamentos gruesos puedan deslizarse hacia atrás cuando una cabeza individual de miosina libera la subunidad de actina a la que estaba unida. De este modo, el filamento grueso se desliza activamente hacia adelante sobre los filamentos delgados adyacentes. Este proceso, coordinado entre los muchos sarcómeros de una fibra muscular, genera la contracción muscular.

La interacción entre la actina y la miosina debe ser regulada de manera que la contracción muscular sólo se produzca como respuesta a las señales adecuadas con origen en el sistema nervioso. De esta regulación se encarga un complejo formado por dos proteínas, la **tropomiosina** y la **troponina (Fig. 5-32)**. La tropomiosina se une al filamento delgado, bloqueando los sitios de fijación para los grupos de las cabezas de miosina. La troponina es una proteína que une Ca^{2+}. El impulso nervioso provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El Ca^{2+} liberado se une a la troponina (otra interacción proteína-ligando) y provoca un cambio conformacional en los complejos de tropomiosina-troponina, exponiendo los sitios de fijación para miosina de los filamentos delgados. A continuación se produce la contracción.

El músculo esquelético en funcionamiento requiere dos tipos de funciones moleculares que son comunes entre las proteínas: unión y catálisis. La interacción entre la actina y la miosina, una interacción de tipo proteína-ligando igual que la que se da entre las inmunoglobulinas y los antígenos, es reversible y no modifica a las moléculas que participan en ella. Sin embargo el ATP se hidroliza a ADP y P_i cuando se une a la miosina. La miosina no es sólo una proteína de unión a actina sino que es también una ATPasa, un enzima. La función de los enzimas como catalizadores de transformaciones químicas es el tema del próximo capítulo.

RESUMEN 5.3 Interacciones proteicas moduladas por energía química: actina, miosina y motores moleculares

- Las interacciones proteína-ligando adquieren un grado especial de organización espacial y temporal en las proteínas motoras. La contracción muscular es el resultado de un conjunto de interacciones entre miosina y actina, acopladas a la hidrólisis del ATP a cargo de la miosina.
- La miosina consiste en dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras que forman un dominio enrollado superhelicoidal fibroso (cola) y un dominio globular (cabeza). Las moléculas de miosina se organizan en filamentos gruesos que se deslizan sobre filamentos delgados compuestos principalmente por actina. La hidrólisis de ATP en la miosina se acopla a una serie de cambios conformacionales en la cabeza de la miosina que conducen a la disociación de la miosina de una

subunidad de actina F y su posterior reasociación con otra subunidad, en una posición más alejada en el filamento delgado. De este modo, la miosina de desliza a lo largo de los filamentos de actina.

■ La contracción muscular es estimulada por la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. El Ca^{2+} se une a la proteína troponina, provocando un cambio conformacional en un complejo troponina-tropomiosina que da lugar al inicio del ciclo de interacciones actina-miosina

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

ligando 157
sitio de fijación 157
encaje inducido 157
hemoglobina 158
hemo 158
porfirina 158
hemoproteína 158
globinas 159
ecuación de equilibrio 160
constante
de asociación, K_a 160
constante
de disociación, K_d 160
proteína alostérica 166
ecuación de Hill 167
efecto Bohr 170
respuesta inmune 174
linfocitos 174
anticuerpo 174
inmunoglobulina 174
linfocitos B
o **células B** 174
linfocitos T
o células **T** 174
antígeno 175
epitopo 175
hapteno 175
plegamiento tipo
inmunoglobulina 177
anticuerpos
policlonales 178
anticuerpos
monoclonalesv178
ELISA 178
inmunotransferencia 178
transferencia
Western 178
miosina 180
actina 181
sarcómero 182

Problemas

1. Relación entre las constantes de afinidad y de disociación La proteína A tiene un sitio de fijación para el ligando X con una K_d de 10^{-6}M. La proteína B tiene un sitio de fijación para el ligando con una K_d de 10^{-9} M. ¿Qué proteína tiene mayor afinidad para el ligando X? Explique el razonamiento. Convierta la K_d en K_a para ambas proteínas.

2. Cooperatividad negativa ¿Cuál de las situaciones siguientes daría lugar a una curva de Hill con $n_H < 1{,}0$? Explique su razonamiento en cada caso.

(a) La proteína tiene múltiples subunidades, cada una con un único sitio de fijación de ligando. La unión del ligando a un sitio disminuye la afinidad de unión de los otros sitios de fijación de ligando.

(b) La proteína es un único polipéptido con dos sitios de fijación de ligando, cada uno de ellos con una afinidad diferente para el ligando.

(c) La proteína es un único polipéptido con un único sitio de fijación de ligando. Una vez purificado, el preparado proteico es heterogéneo y contiene algunas moléculas de proteína que están parcialmente desnaturalizadas, por lo que poseen una menor afinidad de unión para el ligando.

3. Afinidad por el oxígeno en la hemoglobina ¿Cuál es el efecto de los siguientes cambios sobre la afinidad de la hemoglobina por el O_2? (a) Un descenso del pH del plasma sanguíneo de 7,4 a 7,2. (b) Un descenso de la presión parcial de CO_2 en los pulmones de 6 kPa (aguantando la respiración) a 2 kPa (normal). (c) Un aumento del nivel de BPG de 5 mM (altitud normal) a 8 mM (grandes altitudes). (d) Un incremento en CO desde 1,0 parte por millón (ppm) en una atmósfera interior normal hasta 30 ppm en una casa en la que el horno de gas funciona mal o tiene pérdidas.

4. Unión reversible de ligandos I La proteína calcineurina se une a la proteína calmodulina con una velocidad de asociación de $8{,}9 \times 10^3$ $M^{-1}s^{-1}$ y una constante de disociación global, K_d, de 10 nM. Calcule la velocidad de disociación, k_d, y exprésela en las unidades adecuadas.

5. Unión revesible de ligandos II Una proteína se une a un ligando L con una K_d de 400nM. ¿Cual es la concentración de ligando cuando Y es (a) 0,25, (b) 0,6, (c) 0,95?

6. Unión reversible de ligandos III Tres proteínas receptoras de membrana unen fuertemente una hormona. Basándose en los datos de la tabla siguiente, (a) ¿Cuál es la K_d para la unión de la hormona por la proteína 2? (Incluya las unidades adecuadas). (b) ¿Cual de estas proteínas se une *más* fuertemente a esta hormona?

Concentración de hormona (nM)	Y		
	Proteína 1	Proteína 2	Proteína 3
0,2	0,048	0,29	0,17
0,5	0,11	0,5	0,33
1	0,2	0,67	0,5
4	0,5	0,89	0,8
10	0,71	0,95	0,91
20	0,83	0,97	0,95
50	0,93	0,99	0,98

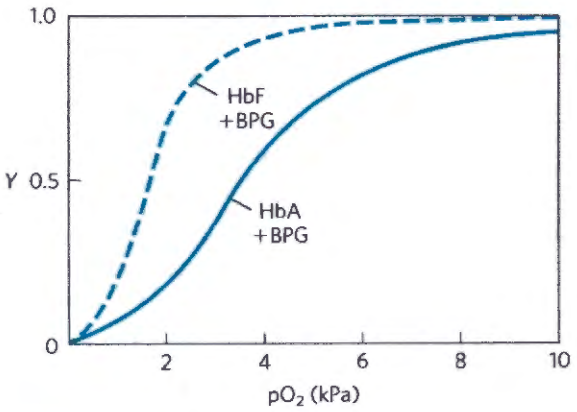
7. Cooperatividad en la hemoglobina En circunstancias adecuadas, la hemoglobina se disocia en sus cuatro subunidades. La subunidad α aislada une oxígeno, pero la curva de saturación de O_2 es hiperbólica en lugar de sigmoidea. Además, la unión de oxígeno a la subunidad α aislada no se ve afectada por la presencia de H^+, CO_2 o BPG. ¿Qué indican estas observaciones sobre el origen de la cooperatividad en la hemoglobina?

8. Comparación de las hemoglobinas fetal y materna Los estudios sobre transporte de oxígeno en mamíferos en estado de gestación han demostrado que las curvas de saturación por O_2 de las sangres materna y fetal son claramente diferentes cuando se miden en las mismas condiciones. Los eritrocitos fetales contienen una variante estructural de la hemoglobina, la HbF, que consiste en dos subunidades α y dos subunidades γ ($\alpha_2\gamma_2$), mientras que los eritrocitos maternos contienen la HbA ($\alpha_2\beta_2$).

(a) ¿Cuál de las dos hemoglobinas tiene una mayor afinidad por el oxígeno en condiciones fisiológicas, la HbA o la HbF? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el significado fisiológico de la diferente afinidad por el oxígeno?

(c) Cuando se retira todo el BPG presente en muestras de HbA y HbF las curvas de saturación de O_2 (y como consecuencia las afinidades por el O_2) se desplazan hacia la izquierda. No obstante, en esta situación la HbA tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la HbF. Cuando se reintroduce el BPG las curvas de saturación de O_2 vuelven a la normalidad, tal como se muestra en el gráfico. ¿Cuál es el efecto del BPG sobre la afinidad por el O_2 de la hemoglobina? ¿Cómo puede utilizarse esta información para explicar las diferentes afinidades por el O_2 de las hemoglobinas fetal y materna?



9. Variantes de la hemoglobina En la naturaleza se presentan casi 500 variantes de la hemoglobina. La mayoría son el resultado de un único cambio de aminoácido en una cadena polipeptídica de globina. Algunas variantes provocan enfermedades aunque no todas tienen efectos negativos. A continuación se presenta una breve muestra:

HbS (Hb de la célula falciforme): sustitución de una Val por un Glu en la superficie

Hb Cowtown: elimina un par iónico implicado en la estabilización del estado T

Hb Memphis: sustitución de un residuo polar sin carga por otro de tamaño similar en la superficie

Hb Bibba: sustitución de una Pro por una Leu implicada en una hélice α

Hb Milwaukee: sustitución de un Glu por una Val

Hb Providence: sustitución de una Lys por una Asn que se proyecta normalmente hacia la cavidad central del tetrámero

Hb Philly: sustitución de una Tyr por una Phe, que rompe el enlace de hidrógeno en la interfase $\alpha_1\beta_1$

Explique su elección para cada una de las siguientes situaciones:

(a) La variante de Hb que tendrá *menor* probabilidad de provocar síntomas patológicos.

(b) La variante o variantes que tengan más probabilidad de mostrar valores de pI diferentes al de la HbA al analizarlas en un gel de enfoque isoeléctrico.

(c) La variante o variantes que tengan más posibilidades de mostrar una disminución en la unión de BPG y un aumento de la afinidad global de la hemoglobina por el oxígeno.

10. Unión de oxígeno y estructura de la hemoglobina Un equipo de bioquímicos utiliza la ingeniería genética para modificar la interfase entre subunidades de hemoglobina. Las variantes resultantes se presentan en disolución principalmente como dímeros $\alpha\beta$ (tetrámeros $\alpha_2\beta_2$ hay pocos, o ninguno). ¿Es probable que estas variantes unan oxígeno más débilmente o más fuertemente? Explique su respuesta.

11. Unión reversible (aunque fuerte) a un anticuerpo Un anticuerpo se une a un antígeno con una K_d de 5×10^{-8} M. ¿A qué concentración de antígeno Y será igual a: (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

12. Uso de anticuerpos para demostrar las relaciones entre estructura y función en las proteínas Un anticuerpo monoclonal se une a la actina G pero no a la actina F. ¿Qué nos dice esto sobre el epitopo reconocido por el anticuerpo?

13. El sistema inmune y las vacunas Un organismo huésped necesita tiempo, a menudo días, para presentar una respuesta inmune frente a un nuevo antígeno, pero las células de memoria permiten una respuesta rápida frente a los patógenos a los que se ha tenido una exposición previa. A menudo, una vacuna que protege frente una determinada infección vírica suele consistir en un virus muerto o inactivado o en proteínas aisladas a partir de una proteína de la envuelta vírica. Normalmente la vacuna no provoca infección ni enfermedad cuando se inyecta en un paciente humano, aunque "enseña" de manera efectiva al sistema inmune cómo son esas partículas víricas, estimulando la producción de células de memoria. Cuando hay una infección posterior, estas células pueden unirse al virus y desencadenar una rápida respuesta inmune. Algunos patógenos, incluido el VIH, han desarrollado mecanismos para eludir la acción del sistema inmune, haciendo que sea muy difícil o incluso imposible el desarrollo de vacunas efectivas frente a ellos. ¿Qué estrategia podría utilizar un patógeno para eludir al sistema inmune? Suponga que el huésped dispone de anticuerpos, receptores T o ambos, capaces de unirse a cualquier estructura que pueda aparecer en la superficie de un patógeno y que, una vez unidos, el patógeno es destruido.

14. El modo en que nos quedamos "tiesos" Cuando se muere un vertebrado superior, sus músculos quedan rígidos al ser privados de ATP, un estado llamado *rigor mortis*. Aplicando su conocimiento sobre el ciclo catalítico de la miosina en la contracción muscular explique la base molecular de este fenómeno.

15. Los sarcómeros desde otro punto de vista La simetría de los filamentos gruesos y delgados dentro de un sarcómero es tal que cada filamento grueso suele estar rodeado por seis filamentos delgados dispuestos en forma hexagonal. Dibuje una sección sagital (corte transversal) de una miofibrilla en los siguientes lugares: (a) en la línea M, (b) a través de la banda I, (c) a través de la región densa de la banda A, (d) a través de la región menos densa de la banda A, adyacente a la línea M (véase la Fig. 5-29b, c).

Bioquímica online

16. Lisozima y anticuerpos Para poder apreciar completamente cómo funcionan las proteínas en una célula es muy útil tener una visión tridimensional de cómo interactúan las proteínas con otros componentes celulares. Afortunadamente, esto es posible utilizando las bases de datos de proteínas que se encuentran en la Web y programas de visualización molecular tridimensional tales como JSmol un visualizador molecular gratuito y de fácil utilización que es compatible con la mayoría de navegadores y sistemas operativos.

En este ejercicio examinará las interacciones entre el enzima lisozima (Capítulo 4) y el fragmento Fab del anticuerpo antilisozima. Utilice el identificador del PDB 1FDL para explorar la estructura del complejo entre el fragmento Fab de IgG1-lisozima (complejo antígeno-anticuerpo). Para responder a las siguientes preguntas, use la información de la página de Resumen de la Estructura del Protein Data Bank (www.rcsb.org) y visualice la estructura utilizando JSmol, o un visualizador similar.

(a) ¿Qué cadenas del modelo tridimensional corresponden al fragmento de anticuerpo y cuales al antígeno, lisozima?

(b) ¿Qué tipo de estructura secundaria predomina en este fragmento Fab?

(c) ¿Cuántos residuos aminoácidos hay en las cadenas pesadas y ligeras del fragmento Fab? ¿ y en la lisozima? Estime el

porcentaje de la molécula de lisozima que interacciona con el sitio de fijación de antígeno del fragmento de anticuerpo.

(d) Identifique los residuos aminoácidos específicos de la lisozima y de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de Fab que están situados en la interfase antígeno-anticuerpo. ¿Son estos residuos contiguos en la secuencia primaria de las cadenas polipeptídicas?

17. Estudio de anticuerpos en el Protein Data Bank Utilice el artículo Molécula del Mes del PDB en www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID-21 para completar los ejercicios siguientes:

(a) ¿Cuantos sitios específicos de fijación de antígeno hay en la primera imagen de inmunoglobulina de la página web (imagen procedente de PDB ID 1IGT)?

(b) Cuando entra un virus en sus pulmones, ¿cuanto tarda Vd. en producir uno o más anticuerpos que se unan al mismo?

(c) ¿Cuantos tipos de anticuerpos diferentes se encuentran presentes, aproximadamente, en su sangre?

(d) Explore la estructura de la molécula de inmunoglobulina (PDB ID 1IGT) de la página web clicando el enlace en el artículo o yendo directamente a www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1igt. Utilice unos de los visores de estructura proporcionados en el sitio PDB para crear una estructura de cintas de esta inmunoglobulina. Identifique las dos cadenas ligeras y las dos cadenas pesadas y asígneles colores diferentes.

Problema de análisis de datos

18. Función proteica Durante la década de 1980 las estructuras de actina y miosina, sólo se conocían la resolución que se observa en la Figura 5-28a, b. A pesar de que se sabía que la parte S1 de la miosina se unía a actina e hidrolizaba ATP, existía mucha discusión acerca de donde se generaba la fuerza de contracción en la molécula de miosina. En aquel momento se propusieron dos modelos alternativos para explicar el mecanismo de generación de fuerza en la miosina.

Según el modelo de la "bisagra", S1 se unía a actina, pero la fuerza de arrastre se generaba por contracción de la "región bisagra" en la cola de la miosina. La región bisagra está en la parte de meromiosina pesada de la molécula de miosina, cerca de donde la tripsina libera por digestión la meromiosina ligera (véase la Fig. 5-27b). Éste es aproximadamente el punto llamado "Dos hélices α superenrolladas" de la Figura 5-27a. Según el modelo "S1", la fuerza de arrastre se generaba en la misma "cabeza" S1 y la cola sólo servía para fines de soporte estructural.

Se llevaron a cabo muchos experimentos sin que dieran lugar a conclusiones claras. En 1987, James Spudich y colaboradores en la Universidad de Stanford publicaron un estudio que, sin ser concluyente, daba un gran paso en la resolución de esta controversia.

Las técnicas de DNA recombinante no estaban entonces lo suficientemente desarrolladas para poder estudiar este tema in vivo, por lo que Spudich y colaboradores usaron un interesante ensayo de motilidad in vitro. El alga *Nitella* tiene células extraordinariamente largas, a menudo de varios centímetros de longitud y de 1 mm de diámetro aproximadamente. En estas células hay fibras de actina que se distribuyen según sus ejes longitudinales y las células se pueden abrir longitudinalmente con lo que quedanexpuestas sus fibras de actina. Spudich y su grupo habían observado que cuentas de plástico recubiertas de miosina podían "caminar" a lo largo de estas fibras en presencia de ATP, del mismo modo como lo hacía la miosina en la contracción muscular.

Para llevar a cabo estos experimentos usaron un método mejor definido para unir la miosina a las cuentas. Las "cuentas" eran aglomerados de células bacterianas muertas (*Staphylococcus aureus*). Estas células tienen una proteína en su superficie que se une a la región Fc de moléculas de anticuerpo (Fig. 5-21a). Los anticuerpos, por su parte, se unen a varios lugares (desconocidos) de la cola de la molécula de miosina. Cuando se preparan complejos cuenta-anticuerpo-miosina con moléculas de miosina intactas, se mueven a lo largo de las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP.

(a) Dibuje un diagrama que muestre el aspecto que podría tener un complejo cuenta-anticuerpo-miosina a nivel molecular.

(b) ¿Por qué era necesario ATP para que las cuentas se movieran a lo largo de las fibras de actina?

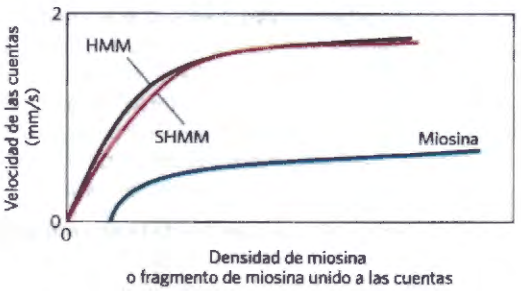
(c) Spudich y colaboradores usaron anticuerpos que se unían a la cola de la miosina. ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a la parte S1 que es la que normalmente se une a actina? ¿Por qué habría fallado este experimento si hubieran utilizado un anticuerpo que se uniera a actina?

Para concentrarse en la parte de la molécula de miosina responsable de la producción de fuerza, Spudich y colaboradores usaron tripsina para producir dos moléculas de miosina parciales (véase la Fig. 5-27b): (1) meromiosina pesada (HMM), generada mediante una breve digestión de miosina con tripsina; HMM contiene la parte S1 y la parte de la cola que incluye la bisagra; y (2) meromiosina pesada corta (SHMM), generada por una digestión más larga de HMM con tripsina; SHMM contiene S1 y una parte más corta de la cola que no incluye la bisagra. Una digestión breve de miosina con tripsina produce HMM y meromiosina ligera por rotura de un único enlace peptídico específico en la molécula de miosina.

(d) ¿Cuál es la razón de que la tripsina pueda atacar este enlace antes que a todos los demás de la miosina?

Spudich y colaboradores prepararon complejos de cuenta-anticuerpo-miosina con cantidades variables de miosina, HMM y SHMM y midieron sus velocidades sobre las fibras de actina de *Nitella* en presencia de ATP. En el gráfico siguiente se representan sus resultados.

(e) ¿Qué modelo ("S1" o "bisagra") es consistente con estos resultados? Explique su razonamiento.



(f) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas aumente con el aumento de la densidad de la miosina.

(g) Proponga una explicación plausible para el hecho de que la velocidad de las cuentas llegue a una meseta a altas densidades de miosina.

La digestión más larga con tripsina necesaria para producir SHMM tenía un efecto secundario: otra rotura específica de la cadena polipeptídica de la miosina además de la que se producía en la cola. El segundo lugar de corte estaba en la cabeza S1.

(h) ¿Por qué resulta sorprendente que SHMM sea todavía capaz de mover las cuentas a lo largo de las fibras de actina?

(i) Se vio que la estructura terciaria de la cabeza S1 permanecía intacta en SHMM. Proponga una explicación plausible para el hecho de que la proteína esté todavía intacta y sea funcional a pesar de que se haya roto la cadena polipeptídica y ya no sea continua.

Referencia

Hynes, T.R., S.M. Block, B.T. White, and J.A. Spudich. 1987. Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* 48:953–963.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 6

Enzimas

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

6.1 Introducción a los enzimas 189

6.2 Funcionamiento de los enzimas 192

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo 200

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas 215

6.5 Enzimas reguladores 227

Existen dos condiciones fundamentales para la vida. En primer lugar, la entidad viva ha de poder autorreplicarse (un tema que se considera en la Parte III); en segundo lugar, ha de poder catalizar reacciones químicas de manera eficiente y selectiva. La importancia central de la catálisis puede sorprender pero es fácil demostrarla. Como se describió en el Capítulo 1, los sistemas vivos utilizan la energía de su entorno. Muchos de nosotros, por ejemplo, consumimos cantidades sustanciales de sacarosa -azúcar de mesa común- como un tipo de combustible, generalmente en forma de alimentos y bebidas dulces. La conversión de la sacarosa en CO_2 y H_2O en presencia de oxígeno es un proceso muy exergónico, que libera energía libre que podemos utilizar para pensar, movernos, saborear y ver. Sin embargo, una bolsita de azúcar se puede almacenar durante años sin que sufra ninguna transformación evidente a CO_2 y H_2O. Siendo este proceso químico termodinámicamente favorable, es, sin embargo, muy lento. Aun así, cuando un humano (o casi cualquier otro organismo) consume sacarosa, la energía química se libera en segundos. La diferencia está en la catálisis. Sin catálisis, las reacciones químicas que, como la de la oxidación de la sacarosa, son necesarias para mantener la vida, no podrían darse en una escala útil de tiempo.

En este capítulo dirigimos, pues, nuestra atención hacia los catalizadores de las reacciones en los sistemas biológicos: los enzimas, las proteínas más notables y de mayor especialización. Los enzimas tienen un gran poder catalítico, a menudo muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, aceleran espectacularmente las reacciones químicas y funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Hay pocos catalizadores no biológicos que tengan todas estas propiedades.

Los enzimas están en el centro de todos los procesos bioquímicos. Actuando en secuencias organizadas catalizan cientos de reacciones consecutivas en las que se degradan nutrientes, se conserva y transforma la energía química y se fabrican las macromoléculas biológicas a partir de precursores sencillos.

El estudio de los enzimas también tiene una importancia práctica inmensa. En algunas enfermedades, especialmente en las que son heredables genéticamente, puede haber una disminución, o incluso una ausencia total, de uno o más enzimas. La actividad excesiva de un enzima específico puede dar lugar también a situaciones patológicas. La medición de la actividad enzimática en el plasma sanguíneo, eritrocitos, o muestras de tejido son importantes en el diagnóstico de ciertas enfermedades. Muchos fármacos ejercen sus efectos biológicos mediante su interacción con enzimas. Los enzimas se usan también como herramientas importantes en ingeniería química, tecnología alimentaria y agricultura.

El capítulo empieza con la descripción de las propiedades de los enzimas y los principios fundamentales de su poder catalítico. Sigue una introducción a la cinética enzimática, disciplina que proporciona gran parte del marco necesario para cualquier discusión sobre los enzimas. Se dan seguidamente algunos ejemplos de mecanismos enzimáticos que ilustran los principios introducidos previamente en el capítulo. Acabamos con una discusión sobre la regulación de la actividad enzimática.

6.1 Introducción a los enzimas

Gran parte de la historia de la bioquímica es la historia de la investigación enzimática. Los catalizadores biológicos se reconocieron como tales y fueron descritos por primera vez a finales del siglo XVIII, en estudios sobre la digestión de la carne por secreciones del estómago; la investigación continuó en el siglo XIX con el examen de la conversión del almidón en azúcar por la saliva y diversos extractos vegetales. Hacia 1850 Louis Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación del azúcar a alcohol por la levadura estaba catalizada por "fermentos". Postuló que tales fermentos eran inseparables de



Eduard Buchner, 1860–1917 [Fuentes: Science Museum/ Science & Society Picture Library.]



James Sumner, 1887–1955 [Fuentes: © Cortesía de Division of Rare and Manuscript Collections, Carl A. Kroch Library, Cornell University, Ithaca, NY. RMC2005_1073.]



J. B. S. Haldane, 1892–1964 [Fuentes: Hans Wild/The LIFE Picture Collection/Getty Images.]

la estructura de las células de levadura vivas; este punto de vista, denominado vitalismo, se mantuvo durante décadas. El descubrimiento de Eduard Buchner en 1897 de que los extractos de levadura pueden fermentar el azúcar a alcohol demostró que las moléculas que intervienen en la fermentación pueden continuar funcionando cuando se separan de la estructura de las células vivas. El experimento de Buchner significó inmediatamente el fin de las nociones vitalistas y el alumbramiento de la ciencia de la bioquímica. Más tarde, Frederick W. Kühne dio el nombre de **enzimas** (del griego *enzymos*, que significa "en la levadura") a las moléculas detectadas por Buchner.

El aislamiento y cristalización de la ureasa por James Sumner en 1926 proporcionó un gran impulso a los primeros estudios sobre los enzimas. Sumner encontró que los cristales de ureasa consistían exclusivamente en proteína y postuló que todos los enzimas son proteínas. A falta de otros ejemplos esta idea fue discutida durante algún tiempo. La conclusión de Sumner sólo se aceptó ampliamente cuando más tarde, en la década de 1930, John Northrop y Moses Kunitz cristalizaron la pepsina, la tripsina y otros enzimas digestivos y encontraron que también eran proteínas. Durante este período, J. B. S. Haldane escribió un tratado denominado *Enzymes* (*Enzimas*). Aunque aún no estaba clara la naturaleza molecular de los enzimas, Haldane apuntó la atractiva sugerencia de que las interacciones por enlaces débiles entre el enzima y su sustrato podrían ser utilizadas para catalizar una reacción. Esta brillante idea está en el centro de nuestro conocimiento actual sobre la catálisis enzimática.

Desde las últimas décadas del siglo XX se han purificado millares de enzimas, de los que se ha elucidado su estructura y explicado su mecanismo de acción.

La mayoría de enzimas son proteínas

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico (Capítulo 26), todos los enzimas son proteínas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si un enzima se desnaturaliza o se disocia en sus subunidades, la actividad catalítica suele desaparecer. Si se descompone un enzima en sus aminoácidos constituyentes, siempre se destruye su actividad catalítica. Así, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas son esenciales para su actividad catalítica.

Los enzimas, al igual que otras proteínas, tienen masas moleculares relativas que van desde unos 12.000 hasta más de 1 millón. Algunos enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que sus residuos aminoácidos. Otros requieren un componente químico adicional llamado **cofactor**. El cofactor puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+} (Tabla 6-1) o una molécula orgánica o metaloorgánica compleja denominada **coenzima**. Los coenzimas actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos (Tabla 6-2). La mayoría de ellos son derivados de vitaminas, nutrientes orgánicos que son necesarios en pequeñas cantidades en la dieta. Describiremos con más detalle los coenzimas cuando nos volvamos a encontrar con ellos en las rutas metabólicas descritas en la Parte II. Algunos enzimas requieren *tanto* un coenzima *como* uno o más iones metálicos para su actividad. Un coenzima o ión metálico unido covalentemente o de manera muy fuerte a la proteína enzimática se denomina **grupo prostético.** Un enzima completo y catalíticamente activo junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina **holoenzima**. La

TABLA 6-1 Algunos iones inorgánicos que actúan como cofactores enzimáticos

Iones	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo oxidasa
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa
K^{+}	Piruvato quinasa
Mg^{2+}	Hexoquinasa, glucosa 6-fosfatasa, piruvato quinasa
Mn^{2+}	Arginasa, ribonucleótido reductasa
Mo	Dinitrogenasa
Ni^{2+}	Ureasa
Zn^{2+}	Carbónico anhidrasa, alcohol deshidrogenasa, carboxipeptidasas A y B.

TABLA 6-2 Algunos coenzimas que actúan como portadores transitorios de átomos o grupos funcionales específicos

Coenzima	Ejemplos de algunos grupos químicos transferidos	Precursor en la dieta para los mamíferos
Biocitina	CO_2	Biotina
Coenzima A	Grupos acilo	Ácido pantoténico y otras moléculas
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B_{12})	Átomos de H y grupos alquilo	Vitamina B_{12}
Flavina adenina dinucleótido	Electrones	Riboflavina (vitamina B_2)
Lipoato	Electrones y grupos acilo	No se requiere en la dieta
Nicotinamida adenina dinucleótido	Ión hidruro ($:H^-$)	Acido nicotínico (niacina)
Piridoxal fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B_6)
Tetrahidrofolato	Grupos monocarbonados	Folato
Tiamina pirofosfato	Aldehídos	Tiamina (vitamina B_1)

Nota: La estuctura y modo de acción de estos coenzimas se describe en la Parte II de este libro.

parte proteica del enzima se denomina **apoenzima** o **apoproteína**. Finalmente, algunos enzimas son modificados covalentemente por fosforilación, glucosilación y otros procesos. Gran parte de estas alteraciones intervienen en la regulación de la actividad enzimática.

Los enzimas se clasifican según la reacción catalizada

Muchos enzimas se han bautizado añadiendo el sufijo "-asa" al nombre de su sustrato o a una palabra o frase que describe su actividad. Así, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la polimerización de nucleótidos en la síntesis del DNA. Otros enzimas recibieron nombres muy generales por parte de sus descubridores, antes de que se supiera cuál era su reacción específica. Por ejemplo, un enzima que actúa en la digestión de la comida se llamó pepsina, del griego *pepsis*, "digestión", y la lisozima recibió su nombre por su capacidad para lisar (romper) las paredes celulares bacterianas. En otros casos el nombre procede de sus fuentes de origen: la tripsina, que recibió su nombre del griego *tryein*, "desgastar", se obtuvo frotando tejido pancreático con glicerina. A veces el mismo enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre. Debido a tales ambigüedades y al número constantemente creciente de enzimas descubiertos, se ha adoptado por acuerdo internacional un sistema de nomenclatura y clasificación de los enzimas. Este sistema distribuye los enzimas en seis clases, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada (Tabla 6-3). A cada enzima se le asigna un número clasificatorio que consta de cuatro partes y un nombre sistemático que identifica la reacción catalizada. Por ejemplo, el nombre sistemático formal del enzima que cataliza la reacción

$$\text{ATP} + \text{D-glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{D-glucosa 6-fosfato}$$

es la ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa, que indica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP a la glucosa. El número de clasificación de este enzima (número E.C., por *E*nzyme *C*ommission) es 2.7.1.1. El primer número (2) denota el nombre de la clase (transferasa); el segundo número (7), la subclase (fosfotransferasa); el tercer número (1), fosfotransferasas con un grupo hidroxilo como aceptor; y el cuarto número (1), que D-glucosa es el aceptor del grupo fosforilo. En muchos casos se utiliza un nombre común de uso más frecuente (en este caso hexoquinasa). La lista y la descripción completa de los miles de enzimas conocidos se mantienen actualizadas por el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). Este capítulo se dedica mayoritariamente a los principios y propiedades comunes a todos los enzimas.

TABLA 6-3 Clasificación internacional de enzimas

Número de clase	Nombre de la clase	Tipo de reacción catalizada
1	Óxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Rotura de C—C, C—O, C—N u otros enlaces por eliminación, dejando dobles enlaces o anillos oaAdición de grupos a dobles enlaces
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C—C, C—S, C—O y C—N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o un cofactor similar

Nota: La estuctura y modo de acción de estos coenzimas se describe en la Parte II de este libro.

RESUMEN 6.1 Introducción a los enzimas

- La vida depende de la existencia de catalizadores poderosos y específicos: los enzimas. Prácticamente todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por un enzima.
- Con la excepción de unas pocas moléculas de RNA catalítico, todos los enzimas conocidos son proteínas. Muchos necesitan coenzimas no proteicos o cofactores para desempeñar su acción catalítica.
- Los enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan. Todos los enzimas tienen números y nombres formales del sistema E.C., y la mayoría tienen también nombres comunes.

6.2 Funcionamiento de los enzimas

La catálisis enzimática de las reacciones es esencial para los sistemas vivos. En condiciones biológicas, las reacciones no catalizadas tienden a ser lentas. La mayoría de moléculas biológicas son muy estables en las condiciones de pH neutro, temperatura suave y ambiente acuoso del interior de las células. Además, muchos procesos químicos comunes son desfavorables o poco probables en el ambiente celular, tales como la formación transitoria de intermedios cargados inestables o la colisión de dos o más moléculas con la orientación precisa requerida para la reacción. Las reacciones necesarias para digerir los alimentos, enviar señales nerviosas o contraer el músculo no se dan a una velocidad útil sin catálisis.

Un enzima soluciona estos problemas al proporcionar un ambiente específico dentro del cual una reacción determinada puede transcurrir más ràpidamente. El rasgo distintivo de una reacción catalizada enzimáticamente es que tiene lugar dentro de los confines de una bolsa del enzima denominada **sitio activo** (Fig. 6-1). La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima se denomina **sustrato**. La superficie del sitio activo del enzima está revestida con residuos aminoácidos con grupos sustituyentes que se unen al sustrato y catalizan su transformación química. A menudo, el sitio activo recubre el sustrato y lo secuestra completamente de la disolución. El complejo enzima-sustrato, cuya existencia fue propuesta por primera vez por Charles-Adolphe Wurtz en 1880, es de importancia central en la acción de los enzimas. Es también el punto de partida de los tratamientos matemáticos que definen el comportamiento cinético de las reacciones catalizadas por enzimas, así como de las descripciones teóricas de los mecanismos enzimáticos.

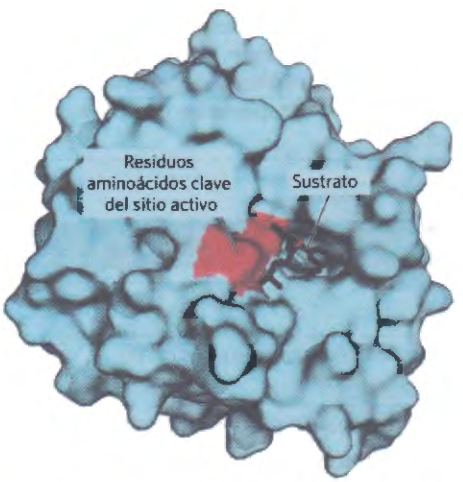


FIGURA 6-1 Fijación de un sustrato al sitio activo de un enzima. El enzima quimotripsina unido a un sustrato. Algunos aminoácidos clave del sitio activo se muestran como manchas rojas en la superficie del enzima. [Fuente: PDB ID 7GCH, K. Brady et al. *Biochemistry* 29: 7600, 1990.]

Los enzimas alteran las velocidades de reacción pero no los equilibrios

Se puede escribir una reacción enzimática sencilla como

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \quad (6\text{-}1)$$

donde E, S y P representan el enzima, el sustrato y el producto, respectivamente. ES y EP son complejos transitorios del enzima con el sustrato y con el producto, respectivamente.

Para entender la catálisis, hemos de apreciar en primer lugar la importante distinción entre equilibrios de reacción y velocidades de reacción. La función de un catalizador es aumentar la *velocidad* de una reacción. Los catalizadores no modifican los *equilibrios* de reacción. (Recuerde que una reacción se encuentra en equilibrio cuando no hay cambio neto en la concentración de reactivos y productos). Cualquier reacción, por ejemplo S D P, se puede describir mediante un diagrama de la coordenada de reacción (**Fig. 6-2**), que es una descripción de los cambios energéticos durante la reacción. Tal como se introdujo en el Capítulo 1, la energía en los sistemas biológicos se describe en función de la energía libre, *G*. En el diagrama de la coordenada se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción (coordenada de la reacción). El punto de partida tanto para la reacción hacia la izquierda como hacia la derecha se denomina **estado basal**, que es la contribución a la energía libre del sistema de una molécula promedio (S o P) bajo un conjunto de condiciones dadas.

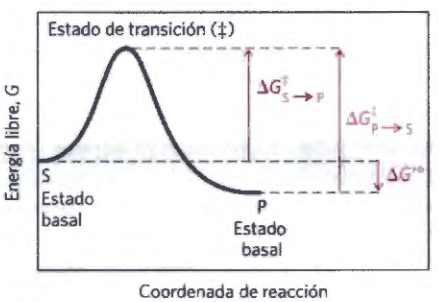


FIGURA 6-2 Diagrama de la coordenada de reacción. Se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción S → P. Un diagrama de este tipo constituye una descripción de los cambios energéticos durante la reacción y el eje horizontal (coordenada de reacción) refleja los cambios químicos progresivos (por ej. rotura o formación de enlaces) a medida que S se convierte en P. Se indican las energías de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, para las reacciones S → P y P → S. $\Delta G'^{\circ}$ es el cambio de energía libre estándar global en la dirección S → P.

›› **Convención Clave:** Para describir los cambios de energía libre de las reacciones, los químicos definen un conjunto de condiciones estándar (temperatura 298 K; presión parcial de cada gas 1 atm o 101,3 kPa; concentración de todos los solutos igual a 1 M) y expresan el cambio de energía libre de un sistema reaccionante como $\Delta G°$, la **variación de energía libre estándar.** Dado que en los sistemas bioquímicos participa normalmente el H^+ en concentraciones muy lejanas de 1 M, los bioquímicos definen la **variación de la energía libre estándar bioquímica** $\Delta G'°$, como la variación de energía libre estándar *a pH 7,0*; emplearemos esta definición a lo largo de todo el libro. En el Capítulo 13 se da una definición más completa de $\Delta G'°$. ‹‹

El equilibrio entre S y P refleja la diferencia en energía libre de sus estados basales. En el ejemplo que se muestra en la Figura 6-2, la energía libre del estado basal de P es inferior a la de S, por lo que $\Delta G'°$ de la reacción es negativo (la reacción es exergónica) y en el equilibrio hay más P que S (el equilibrio favorece a P). La posición y la dirección de este equilibrio *no* están afectadas por ningún catalizador.

Un equilibrio favorable no indica que la conversión S ⟶ P tenga lugar a una velocidad detectable. La *velocidad* de una reacción depende de un parámetro totalmente diferente. Existe una barrera energética entre S y P que representa la energía requerida para el alineamiento de los grupos reactivos, la formación de cargas transitorias inestables, los reordenamientos de enlaces y otras transformaciones que se requieren para que la reacción tenga lugar en cualquiera de las dos direcciones. Esto viene representado por la "colina" energética de las Figuras 6-2 y 6-3. Para que haya reacción las moléculas han de superar esta barrera por lo que se deben llevar a un nivel energético superior. En la cumbre de la colina energética existe un punto en el que la caída hacia el estado S o P es igualmente probable (en los dos casos, el camino es de bajada). Es lo que se denomina el **estado de transición**. El estado de transición no es una especie química con estabilidad significativa, por lo que no se ha de confundir con un intermedio de reacción (tal como ES o EP). Es, simplemente, un momento molecular fugaz en el que acontecimientos tales como rotura de enlaces, formación de enlaces y desarrollo de cargas han llegado al instante preciso en el que el colapso hacia sustrato o hacia producto es igualmente probable. La diferencia entre los niveles de energía del estado basal y del estado de transición se denomina **energía de activación,** $\Delta G^‡$. La velocidad de una reacción refleja esta energía de activación: a una energía de activación más elevada corresponde una reacción más lenta. Las velocidades de reacción pueden aumentarse incrementando la temperatura y/o la presión, mediante las que se aumenta el número de moléculas con energía suficiente para superar la barrera energética. De modo alternativo, es posible disminuir la energía de activación añadiendo un catalizador **(Fig. 6-3)**. *Los catalizadores aumentan las velocidades de reacción disminuyendo las energías de activación.*

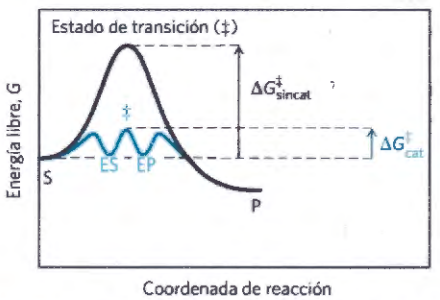


FIGURA 6-3 Diagrama de coordenada de reacción en la que se comparan las reacciones catalizada por enzima y sin catalizar. En la reacción S ⇄ P, los intermedios ES y EP ocupan mínimos en la curva de progreso energético de la reacción catalizada enzimáticamente. Los términos $\Delta G^‡_{sincat}$ y $\Delta G^‡_{cat}$ corresponden a las energías de activación de las reacciones sin catalizar y catalizada, respectivamente. La energía de activación del proceso global es menor cuando el enzima cataliza la reacción.

Los enzimas no constituyen una excepción a la regla de que los catalizadores no modifican el equilibrio de reacción. Las flechas bidireccionales de la ecuación 6-1 ilustran este punto: cualquier enzima que catalice la reacción S ⟶ P también cataliza la reacción P ⟶ S. El papel de los enzimas es *acelerar* la interconversión de S y P. No se gasta enzima en el proceso y el punto de equilibrio no queda afectado. No obstante, la reacción alcanza el equilibrio de una manera mucho más rápida cuando se halla presente el enzima adecuado ya que incrementa la velocidad de la reacción.

Se puede ilustrar este principio general considerando la reacción de la sacarosa con el oxígeno para formar dióxido de carbono y agua:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightleftharpoons 12CO_2 + 11H_2O$$

Esta transformación, que se realiza a través de una serie de reacciones separadas, tiene una $\Delta G'°$ muy grande y negativa por lo que la cantidad de sacarosa presente en el equilibrio es despreciable. No obstante, la sacarosa es un compuesto estable ya que la barrera de activación energética que debe superar antes de reaccionar con el oxígeno es muy alta. La sacarosa puede almacenarse en un recipiente en presencia de oxígeno de manera casi indefinida sin que reaccionen. Sin embargo, en las células, la sacarosa es degradada a CO_2 y H_2O a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas. Estos enzimas no sólo aceleran las reacciones sino que las organizan y controlan de tal manera que gran parte de la energía liberada en este proceso se recupera en otras formas químicas asequibles a la célula para que realice sus funciones. La ruta de reacciones mediante las que la sacarosa (y otros azúcares) se degradan es la ruta primaria de formación de energía para las células, y los enzimas de esta ruta permiten que la secuencia de reacciones tenga lugar en una escala de tiempo biológicamente útil.

Cualquier reacción puede consistir en varias etapas que suponen la formación y desintegración de especies químicas transitorias denominadas **intermedios de reacción.*** Un intermedio de reacción es cualquier especie producida en el transcurso de la reacción que tenga un tiempo de vida químico finito (y mayor que el

*En este capítulo los términos *paso* e *intermedio* se refieren a especies químicas en la ruta de reacción de una reacción catalizada por un único enzima. En el contexto de las rutas metabólicas en las que participan múltiples enzimas (Parte II de este libro), estos términos se utilizan de manera algo diferente. Una reacción enzimática completa recibe a menudo el nombre de "paso" de una ruta y el producto de la reacción de un enzima (que es el sustrato para el siguiente enzima de la ruta) se suele denominar "intermedio" o "intermediario".).

de una vibración molecular, ~10^{-13} segundos). Cuando la reacción S D P está catalizada por un enzima, los complejos ES y EP pueden ser considerados intermedios a pesar de que S y P sean especies químicas estables (Ecn. 6-1); los complejos ES y EP ocupan valles en el diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6-3). En el curso de una reacción catalizada enzimáticamente suelen existir otros intermedios químicos adicionales y menos estables. La interconversión de dos intermedios de reacción secuenciales constituye, por tanto, un paso de la reacción. Cuando en una reacción existen varios pasos, la velocidad global viene determinada por el paso (o pasos) cuya energía de activación sea más elevada; este paso se denomina **paso limitante de velocidad**. En un caso sencillo, el paso limitante de velocidad es el punto de energía más elevado en el diagrama de interconversión de S y P. En la práctica, el paso limitante de velocidad puede cambiar con las condiciones de reacción y en el caso de muchos enzimas puede haber varios pasos con energías de activación similares, lo que significa que todos ellos son parcialmente limitantes de la velocidad.

Las energías de activación son barreras energéticas para las reacciones químicas. Estas barreras son cruciales para la propia vida. La velocidad a la que una molécula se transforma en una reacción química determinada desciende al aumentar la barrera de activación de esta reacción. Sin estas barreras energéticas, las macromoléculas complejas revertirían espontáneamente a formas moleculares mucho más sencillas y no podrían existir ni las estructuras coruplejas y altamente ordenadas ni los procesos metabólicos que tienen lugar en las células. Los enzimas han evolucionado para disminuir *selectivamente* las energías de activación de las reacciones necesarias para la supervivencia celular.

Las velocidades de reacción y los equilibrios tienen definiciones termodinámicas precisas

Los *equilibrios* de reacción están unidos inextricablemente a la variación de energía libre estándar de la reacción, $\Delta G'^{\circ}$, mientras que las *velocidades* de reacción están unidas a la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$. Una introducción básica a estas relaciones termodinámicas constituye el próximo paso para saber cómo funcionan los enzimas.

TABLA 6-4 Relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kl/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^{1}	−5,7
10^{2}	−11,4
10^{3}	−17,1

Nota: La relación se calcula a partir de $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$ (Ecn 6-3).

Un equilibrio tal como S D P viene descrito por una **constante de equilibrio, K_{eq}**, o simplemente K. En las condiciones estándar utilizadas para comparar los procesos bioquímicos, una constante de equilibrio se denota por K'_{eq} (o K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \qquad (6\text{-}2)$$

Partiendo de la termodinámica, puede describirse la relación entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ mediante la expresión

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (6\text{-}3)$$

donde R es la constante de los gases (8,315 J/mol·K) y T es la temperatura absoluta 298 K (25 °C). La ecuación 6-3 se desarrollará y discutirá detalladamente en el Capítulo 13. Aquí el punto importante es que la constante de equilibrio está relacionada directamente con el cambio de energía libre estándar global de la reacción (Tabla 6-4). Un valor negativo grande de $\Delta G'^{\circ}$ refleja un equilibrio de reacción favorable (la cantidad de producto en el equilibrio es mucho mayor que la de sustrato) aunque, tal como se ha comentado antes, esto no significa que la reacción transcurra a una velocidad elevada.

La velocidad de una reacción viene determinada por la concentración de reactivo (o reactivos) y por una **constante de velocidad** generalmente representada por el símbolo k. Para la reacción unimolecular S → P, la velocidad de la reacción, V, que representa la cantidad de S que reacciona por unidad de tiempo, viene expresada por una **ecuación de velocidad**:

$$V = k[S] \qquad (6\text{-}4)$$

En esta reacción, la velocidad sólo depende de la concentración de S. Es lo que se denomina una reacción de primer orden. El factor k es una constante de proporcionalidad que refleja la probabilidad de reacción bajo un conjunto de condiciones (pH, temperatura, etc.). Aquí, k es una constante de velocidad de primer orden y sus unidades son tiempos inversos, como por ejemplo s^{-1}. Si una reacción de primer orden tiene una constante de velocidad k de 0,03 s^{-1} se puede interpretar (cualitativamente) que 3% de sustrato asequible será convertido en P en 1 s. Una reacción con una constante de velocidad de 2.000 s-1 estará lista en una pequeña fracción de segundo. Si una velocidad de reacción depende de la concentración de dos compuestos diferentes, o si reaccionan dos moléculas del mismo compuesto, la reacción es de segundo orden y k es una constante de velocidad de segundo orden (con unidades $M^{-1}s^{-1}$). La ecuación de la velocidad tiene entonces la forma

$$V = k[S_1][S_2] \qquad (6\text{-}5)$$

Aplicando la teoría del estado de transición se puede deducir una expresión que relaciona la magnitud de la constante de velocidad con la energía de activación:

$$k = \frac{\mathbf{k}T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \qquad (6\text{-}6)$$

en donde $\mathbf{k}$ es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck. El punto importante es que esta relación entre la constante de velocidad k y la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, es inversa y exponencial. En forma simplificada ésta es la base de la afirmación de que una

TABLA 6-5 Algunos incrementos de velocidad producidos por los enzimas

Ciclofilina	10^5
Carbónico anhidrasa	10^7
Triosa fosfato isomerasa	10^9
Carboxipeptidasa A	10^{11}
Fosfoglucomutasa	10^{12}
Succinil-CoA transferasa	10^{13}
Ureasa	10^{14}
Oritidina monofosfato descarboxilasa	10^{17}

energía de activación menor significa una velocidad de reacción mayor.

A continuación variamos el enfoque desde lo que *hacen* los enzimas a *como* lo hacen.

Unos pocos principios explican el poder catalítico y la especificidad de los enzimas

Los enzimas son catalizadores extraordinarios. Los aumentos de velocidad conseguidos por los enzimas son de 5 a 17 órdenes de magnitud (Tabla 6-5). Los enzimas son también muy específicos, discriminando fácilmente entre sustratos con estructuras muy similares. ¿Cómo se pueden explicar estos incrementos enormes y altamente selectivos en su velocidad? ¿De dónde viene la energía que proporciona un descenso espectacular de las energías de activación de reacciones específicas?

La respuesta a estas preguntas tiene dos partes distintas pero relacionadas. La primera se basa en las reordenaciones de los enlaces covalentes durante una reacción catalizada por un enzima. Entre sustratos y grupos funcionales de los enzimas (cadenas laterales específicas de aminoácidos, iones metálicos y coenzimas) tienen lugar reacciones químicas de muchos tipos. Los grupos funcionales catalíticos de los enzimas pueden formar enlaces covalentes transitorios con un sustrato, activándolo para la reacción, o bien puede transferirse transitoriamente un grupo del sustrato al enzima. En muchos casos, estas reacciones sólo tienen lugar en el sitio activo del enzima. Las interacciones covalentes entre enzimas y sustratos hacen disminuir la energía de activación (por lo que aceleran la reacción), proporcionando un camino de reacción alternativo y de menor energía. En la Sección 6.4 se describen diversos tipos específicos de reestructuraciones en reacciones enzimáticas.

La segunda parte de la explicación se basa en las interacciones *no covalentes* entre el enzima y el sustrato. Recuerde del Capítulo 4 que interacciones débiles, no covalentes, ayudan a estabilizar la estructura proteica y las interacciones proteína-proteína. Estas mismas interacciones son críticas en la formación de complejos entre proteína y moléculas pequeñas entre las que se incluyen los sustratos enzimáticos. Gran parte de la energía requerida para disminuir la energía de activación procede generalmente de interacciones débiles no covalentes entre el sustrato y el enzima. El factor que diferencia realmente a los enzimas de la mayoría de catalizadores no enzimáticos es la formación de un complejo ES específico. La interacción entre enzima y sustrato en este complejo está mediada por las mismas fuerzas que estabilizan la estructura proteica, entre ellas puentes de hidrógeno e interacciones iónicas e hidrofóbicas (Capítulo 4). El establecimiento de cada interacción débil en el complejo ES viene acompañado por la liberación de una pequeña cantidad de energía libre que estabiliza la interacción. La energía procedente de la interacción enzima-sustrato se denomina **energía de fijación, ΔG_B**. Su significado se extiende más allá del de una simple estabilización de la interacción enzima-sustrato. *La energía de fijación es la principal fuente de energía libre utilizada por los enzimas para disminuir la energía de activación de las reacciones.*

Hay dos principios fundamentales que están interrelacionados y que proporcionan una explicación general de cómo los enzimas aprovechan la energía de unión no covalente.

1. La mayor parte del poder catalítico de los enzimas procede en último término de la energía libre emitida al formarse los múltiples enlaces débiles e interacciones entre un enzima y su sustrato. Esta energía de fijación contribuye tanto a la especificidad como a la catálisis.
2. Las interacciones débiles están optimizadas en el estado de transición de la reacción; los sitios activos de los enzimas son complementarios no a los sustra-

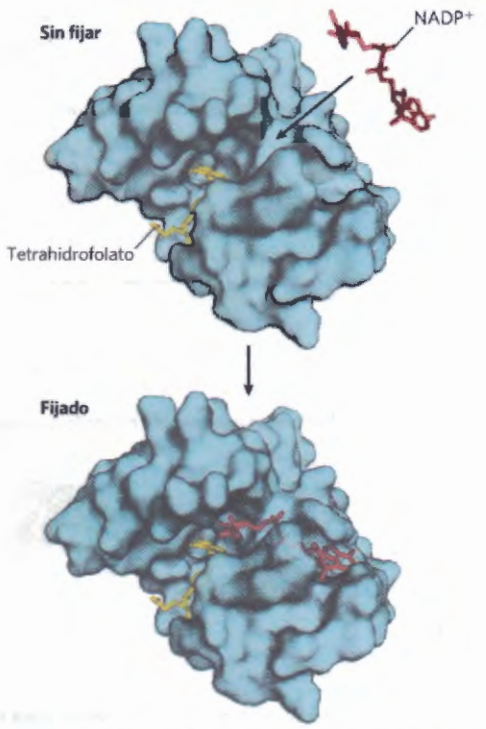


FIGURA 6-4 Formas complementarias de un sustrato y su sitio de fijación sobre un enzima. Se muestra el enzima dihidrofolato reductasa con su sustrato $NADP^+$ sin fijar y fijado. También es visible otro sustrato unido, el tetrahidrofolato (PDB ID 1RA2). En este modelo el $NADP^+$ se fija a una bolsa que le es complementaria en forma y propiedades iónicas, una ilustración de la hipótesis de Emil Fisher de la "llave y cerradura" de la acción enzimática. En realidad, la complementariedad entre la proteína y el ligando (en este caso el sustrato) raras veces es perfecta, tal como hemos visto en el Capítulo 5.

tos per se, sino a los estados de transición a través de los que pasan los sustratos al ser convertidos en productos durante una reacción enzimática.

Estos temas son vitales para la comprensión de los enzimas y pasan a ser ahora el foco principal de interés de este capítulo.

Las interacciones débiles entre enzima y sustrato son óptimas en el estado de transición

¿Cómo utiliza un enzima la energía de fijación para disminuir la energía de activación de la reacción? La formación del complejo ES no es por sí misma la explicación por bien que algunas de las primeras consideraciones sobre los mecanismos de reacción empezaron con esta idea. Estudios sobre la especificidad enzimática llevados a cabo por Emil Fischer le llevaron a proponer, en 1894, que los enzimas eran estructuralmente complementarios a sus sustratos, de modo que se acoplaban del mismo modo que una llave y una cerradura **(Fig. 6-4)**. Esta elegante idea de que una interacción específica (exclusiva) entre dos moléculas biológicas está facilitada por superficies moleculares con formas complementarias, ha influido profundamente en el desarrollo de la bioquímica y se halla en el centro de muchos procesos bioquímicos. No obstante, la hipótesis de la "llave y cerradura" puede ser engañosa cuando se aplica a la catálisis enzimática. Un enzima totalmente complementario a su sustrato sería un enzima muy deficiente, como podemos demostrar.

Consideremos una reacción imaginaria, la rotura de una varilla metálica magnética. La reacción no catalizada se muestra en la **Figura 6-5a**. Examinemos ahora dos enzimas imaginarios (dos "varillasas") que pudieran catalizar esta reacción, utilizando en ambos casos fuerzas magnéticas como ejemplo de la energía de fijación utilizada por los enzimas reales. Diseñemos en primer lugar un enzima perfectamente complementario al sustrato (Fig. 6-5b). El sitio activo de esta varillasa es una bolsa forrada con imanes. Para que se dé la reacción (rotura), la varilla debe alcanzar el estado de transición de la reacción, pero la varilla se adapta de manera tan

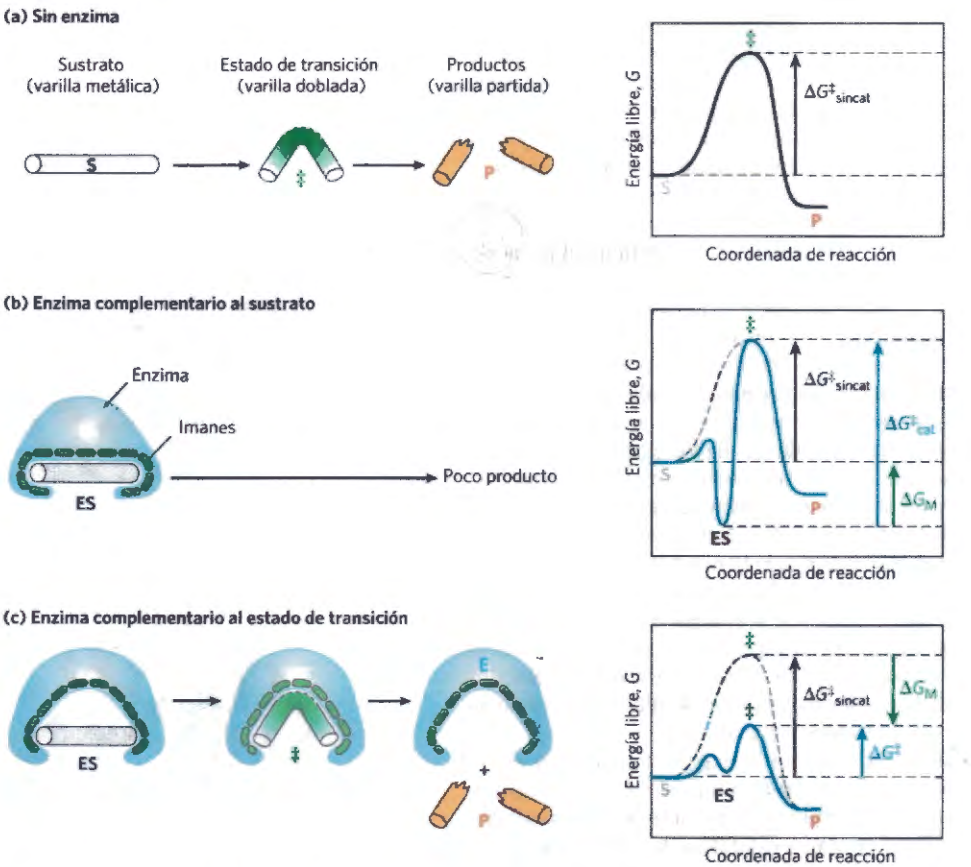


FIGURA 6-5 Enzima imaginario (varillasa) diseñado para catalizar la rotura de una varilla metálica. **(a)** Para que se rompa la varilla en preciso doblarla en primer lugar (estado de transición). En ambos ejemplo de "varillasa", las interacciones magnéticas ocupan el lugar de las interacciones por enlaces débiles entre enzima y sustrato. **(b)** Una varillasa con una bolsa forrada con imanes complementaria en su estructura a la varilla (sustrato), la estabiliza. El doblamiento estará impedido por la atracción magnética entre la varilla y la varillasa. **(c)** Un enzima con una bolsa complementaria al estado de transición de la reacción ayudará a desestabilizar la varilla dando lugar a la catálisis de la reacción. Las interacciones magnéticas proporcionan energía que compensa el incremento de energía libre requerido para doblar la varilla. Los diagramas de la coordenada de reacción (derecha) muestran las consecuencias energéticas de la complementariedad con el sustrato frente a la complementariedad con el estado de transición (se han omitido los complejos EP). El término ΔGM, la diferencia entre las energías del estado de transición de las reacciones no catalizada y catalizada, procede de las interacciones magnéticas entre la varilla y la varillasa. Cuando el enzima es complementario al sustrato **(b)**, el complejo ES es más estable y tiene menos energía libre en el estado basal que el sustrato solo. El resultado es un *incremento* de la energía de activación.

fuerte al sitio activo que no puede doblarse, ya que la curvatura de la varilla eliminaría algunas de las interacciones magnéticas entre la varilla y el enzima. Un enzima así *impide* la reacción ya que lo que hace es estabilizar el sustrato. En un diagrama de la coordenada de reacción (Fig. 6-5b), este tipo de complejo ES correspondería a un pozo energético del que le sería muy difícil salir al sustrato. Tal enzima no tendría ninguna utilidad.

La noción moderna de la catálisis enzimática, propuesta primeramente por Michael Polanyi (1921) y por Haldane (1930) y después elaborada por Linus Pauling en 1946 y por William P. Jencks en la década de 1970 dice: para que un enzima catalice una reacción ha de ser complementario al *estado de transición de la reacción*. Ello significa que las interacciones óptimas entre sustrato y enzima sólo pueden tener lugar en el estado de transición. La Figura 6-5c demuestra de qué modo puede actuar un enzima de este tipo. La varilla de metal se fija a la varillasa, pero sólo se utilizan unas cuantas interacciones para formar el complejo ES. El sustrato ligado aún ha de experimentar el aumento de energía libre necesario para alcanzar el estado de transición. Ahora, sin embargo, el incremento de energía libre requerido para llevar la varilla a una conformación curva y parcialmente partida queda nivelado, o es "pagado", por las interacciones magnéticas (energía de fijación) que se forman entre el enzima y el sustrato en el estado de transición. Muchas de estas interacciones se dan en partes de la varilla distantes del punto de rotura; así, las interacciones entre el enzima y partes no reactivas del sustrato proporcionan una parte de la energía necesaria para catalizar su rotura. Esta "factura energética" se traduce en una energía de activación neta inferior y una mayor velocidad de reacción.

Los enzimas reales funcionan según un principio análogo. En el complejo ES se forman algunas interacciones débiles, pero el complemento total de las interacciones débiles posibles entre sustrato y enzima sólo se forman cuando el sustrato alcanza el estado de transición. La energía libre (energía de fijación) liberada por la formación de esas interacciones equilibra parcialmente la energía requerida para llegar a la cima de la colina energética. La suma de la energía de activación desfavorable (positiva) $\Delta G^{\ddagger}$ y la energía de fijación ΔG_B favorable (negativa) da como resultado una energía de activación *neta* menor **(Fig. 6-6)**. El estado de transición tampoco es una especie estable en el enzima, sino que representa un punto breve del tiempo en que un sustrato permanece en la cima de la colina energética. Sin embargo, la reacción catalizada por el enzima es mucho más rápida que el proceso sin catalizar, porque la colina es mucho más baja. El principio importante subyacente es que *las interacciones de fijación débiles entre el enzima y el sustrato proporcionan una fuerza motriz sustancial para la catálisis enzimática*. Los grupos del sustrato que intervienen en estas interacciones débiles pueden estar situados a cierta distancia de los enlaces que se rompen o modifican. Las interacciones débiles formadas únicamente en el estado de transición son las que contribuyen de modo principal a la catálisis.

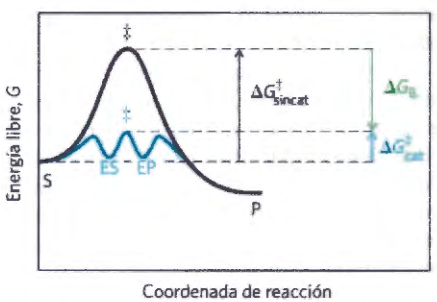


FIGURA 6-6 Papel de la energía de fijación en la catálisis. Para disminuir la energía de activación de una reacción el sistema ha de adquirir una cantidad de energía equivalente a la cantidad en que disminuye $\Delta G^{\ddagger}$. Gran parte de esta energía proviene mayoritariamente de la energía de fijación (ΔGB) conseguida en la formación de interacciones no covalentes débiles entre sustrato y enzima en el estado de transición. El papel de ΔGB es análogo al de ΔGM en la Fig. 6-5.

La necesidad de múltiples interacciones débiles para impulsar la catálisis es una de las razones de que los enzimas (y algunos coenzimas) sean tan grandes. Un enzima ha de aportar grupos funcionales para interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno y otras interacciones y ha de posicionar estos grupos de forma precisa para que la energía de fijación en el estado de transición sea óptima. Se obtendrá una correcta fijación si el sustrato se ubica en una cavidad (el sitio activo) donde se encuentre alejado del agua de forma efectiva. El tamaño de las proteínas refleja la necesidad de la existencia de superestructuras que permitan mantener la interacción de grupos correctamente posicionados y que mantengan al mismo tiempo inalterable la cavidad del sitio activo.

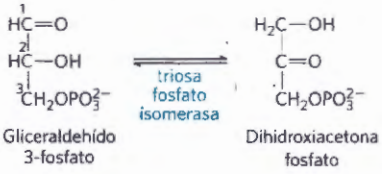
La energía de fijación contribuye a la especificidad de reacción y a la catálisis

¿Pueden explicarse cuantitativamente las enormes aceleraciones de velocidad conseguidas por los enzimas en base a la energía de fijación? Sí. Como punto de referencia, la Ecuación 6-6 nos permite calcular que $\Delta G^{\ddagger}$ debe disminuir unos 5,7 kJ/mol para acelerar una reacción de primer orden en un factor de diez, en las condiciones que se encuentran normalmente en las células. La energía disponible a partir de la formación de una sola interacción débil se calcula generalmente entre 4 y 30 kJ/mol. La energía global disponible a partir de varias interacciones de este tipo es, por tanto, suficiente para hacer disminuir las energías de activación los 60 a 100 kJ/mol requeridos para explicar los grandes aumentos de velocidad observados en muchos enzimas.

La misma energía de fijación que aporta energía para la catálisis también hace que el enzima sea específico. La **especificidad** se refiere a la capacidad de un enzima de discriminar entre un sustrato y una molécula competidora. Conceptualmente, la especificidad es fácil de distinguir de la catálisis. No obstante, la catálisis y la especificidad son mucho más difíciles de diferenciar experimentalmente porque surgen del mismo fenómeno. Si el sitio activo de un enzima tiene grupos funcionales ordenados de manera óptima para formar una serie de interacciones débiles con un sustrato determinado en el estado de transición, el enzima no podrá interaccionar tan bien con ninguna otra molécula. Por ejemplo, si el sustrato tiene un grupo hidroxilo que

forma un puente de hidrógeno específico con un residuo Glu del enzima, cualquier molécula que carezca de este grupo hidroxilo concreto será, en general, un peor sustrato para el enzima. Además, cualquier molécula con un grupo funcional extra para el que el enzima no contiene una bolsa o sitio de fijación será muy probablemente excluida del enzima. En general, la *especificidad* proviene de la formación de múltiples interacciones débiles entre el enzima y su molécula de sustrato específica.

Es posible demostrar la importancia de la energía de fijación en la catálisis. Por ejemplo, el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión entre el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato:



En esta reacción se reordenan los grupos carbonilo e hidroxilo de los carbonos 1 y 2. Sin embargo, se ha observado que más del 80% de la aceleración de la velocidad de reacción procede de las interacciones enzima-sustrato en las que interviene el grupo fosfato del carbono 3 del sustrato. Se llegó a esta conclusión mediante una cuidadosa comparación de las reacciones catalizadas enzimáticamente sobre gliceraldehído 3-fosfato y sobre gliceraldehído (sin grupo fosfato en la posición 3) como sustratos.

Los principios generales antes esbozados se pueden ilustrar mediante diversos mecanismos catalíticos reconocidos. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes por lo que un enzima determinado puede incorporar varios tipos en su propio mecanismo de acción global.

Consideremos lo que se necesita para que una reacción tenga lugar. Entre los factores físicos y termodinámicos principales que contribuyen al valor de $\Delta G^{\ddagger}$, la barrera para una reacción, se podrían incluir: (1) la entropía (libertad de movimiento) de las moléculas en solución, que reduce la posibilidad de que reaccionen entre ellas; (2) la capa de solvatación del agua unida por puentes de hidrógeno que rodea y ayuda a estabilizar muchas biomoléculas en disolución acuosa; (3) la distorsión de los sustratos que ha de tener lugar en muchas reacciones y (4) la necesidad de conseguir un alineamiento adecuado de los grupos funcionales catalíticos en el enzima. Se puede utilizar la energía de fijación para superar todas estas barreras.

En primer lugar, una gran restricción en los movimientos relativos de dos sustratos que han de reaccionar, o **reducción de entropía**, es uno de los beneficios obvios de su fijación al enzima. La energía de fijación mantiene los sustratos en la orientación correcta para reaccionar, lo que es una contribución muy importante a la catálisis ya que las colisiones productivas entre moléculas en disolución pueden ser extremadamente raras. Los sustratos se pueden alinear sobre el enzima de forma precisa, gracias a un gran número de interacciones débiles entre ellos y grupos localizados de manera estratégica en el enzima, lo que mantiene las moléculas de sustrato en las posiciones adecuadas. Algunos

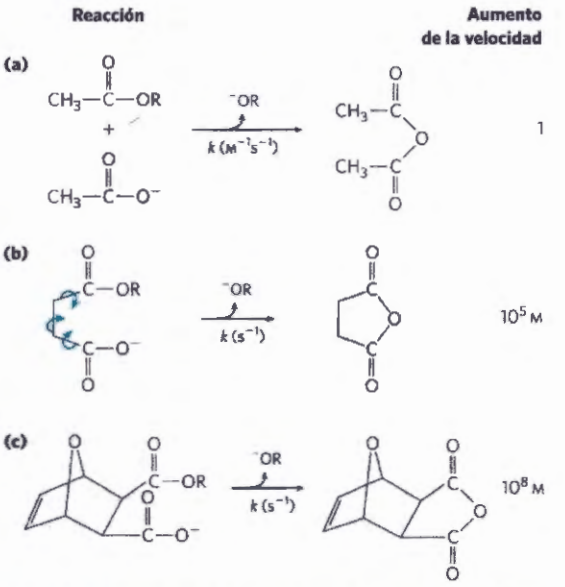


FIGURA 6-7 Aumento de la velocidad por reducción de la entropía. Se muestran las reacciones de un éster con un grupo carboxilato para formar un anhídrido. El grupo R es el mismo en todos los casos. **(a)** Para esta reacción bimolecular la constante de reacción k es de segundo orden y tiene como unidades M-1 s-1. **(b)** Cuando los dos grupos reaccionantes forman parte de la misma molécula y, por tanto, tienen menos libertad de movimiento, la reacción es mucho más rápida. Para esta reacción unimolecular k tiene como unidades s-1. Dividiendo la constante de velocidad de (b) por la constante de velocidad de (a) se obtiene un incremento de velocidad de aproximadamente 105 M. (El incremento tiene unidades de molaridad debido a que estamos comparando una reacción unimolecular con una bimolecular.) En otras palabras, si el reactivo en (b) estuviera presente a una concentración 1 M, los grupos reactivos se *comportarían* como si estuvieran presentes a una concentración de 105 M. Obsérvese que el reactivo en (b) tiene libertad de rotación alrededor de tres enlaces (mostrados con flechas curvadas), pero a pesar de esto la reducción de la entropía en relación con (a) es todavía sustancial. Si los enlaces que rotan en (b) están restringidos como en **(c)**, la entropía disminuye todavía más y la reacción muestra un incremento de velocidad de 108 M en relación con (a).

estudios han demostrado que la restricción del movimiento de dos reactivos puede producir incrementos de velocidad de muchos órdenes de magnitud **(Fig. 6-7)**.

En segundo lugar, la formación de enlaces débiles entre enzima y sustrato también da lugar a la **desolvatación** del sustrato. Interacciones enzima-sustrato reemplazan la mayoría de, o incluso todos, los enlaces de hidrógeno que puedan existir entre el sustrato y el agua que, de otro modo, impedirían la reacción. En tercer lugar, la energía de fijación correspondiente a las interacciones débiles formadas únicamente durante el estado de transición de la reacción ayuda a compensar termodinámicamente cualquier distorsión, principalmente en forma de redistribución electrónica, que debe experimentar el sustrato para reaccionar.

Finalmente, el propio enzima puede experimentar un cambio en la conformación cuando se fija el sustrato inducido por múltiples interacciones débiles con el sustrato. Esta situación se conoce como **encaje inducido**, un mecanismo postulado por Daniel Koshland en 1958. Los movimientos pueden afectar a una pequeña zona del enzima cerca del sitio activo o implicar cambios en

la posición de dominios enteros. Normalmente, se genera una red de movimientos acoplados en todo el enzima que da lugar en último término a los cambios necesarios en el sitio activo. El encaje inducido sirve para disponer grupos funcionales específicos del enzima en la posición adecuada para catalizar la reacción. El cambio de conformación también permite la formación de interacciones débiles adicionales en el estado de transición. En cualquier caso, la nueva conformación del enzima ha incrementado sus propiedades catalíticas. Como ya hemos visto (Capítulo 5), el encaje inducido es una característica usual en la unión reversible de los ligandos a las proteínas. El encaje inducido también es importante en la interacción de casi todos los enzimas con sus sustratos.

Grupos catalíticos específicos contribuyen a la catálisis

En la mayoría de enzimas, la energía de fijación utilizada para formar el complejo ES es sólo una de las diversas contribuciones al mecanismo catalítico general. Una vez unido el sustrato al enzima, grupos funcionales catalíticos situados adecuadamente colaboran en la rotura o formación de enlaces mediante diversos mecanismos entre los que se encuentran la catálisis ácido-base general, la catálisis covalente, y la catálisis por iones metálicos. Estos mecanismos son diferentes de los basados en la energía de fijación porque generalmente suponen una interacción *covalente* transitoria con un sustrato, o la transferencia de grupos desde o hacia un sustrato.

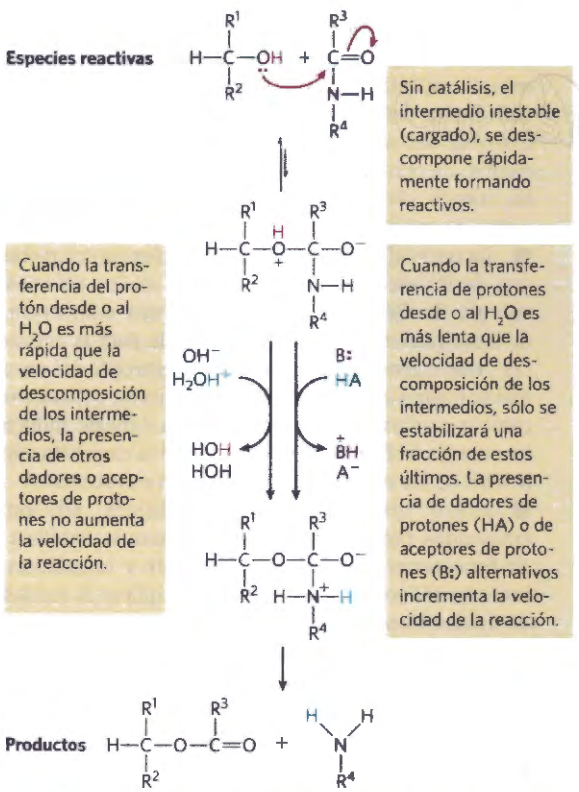


FIGURA 6-8 Modo en que un catalizador supera la formación desfavorable de carga durante la rotura de una amida. Aquí se muestra la hidrólisis de un enlace amida, la misma reacción que catalizan la quimotripsina y otras proteasas. La formación de carga resulta desfavorable y se puede evitar mediante la donación de un protón por parte de H3O+ (catálisis ácida específica) o por parte de HA (catálisis ácida general), donde HA representa cualquier ácido. De modo parecido se puede neutralizar la carga por captación del protón por parte de OH^- (catálisis básica específica) o B: (catálisis básica general), donde B: representa cualquier base.

Catálisis ácido-base general La transferencia de un protón es la reacción individual más frecuente en bioquímica. En el transcurso de la mayoría de reacciones que tienen lugar en la s células se produce una o, a menudo, varias transferencias protónicas. Muchas reacciones bioquímicas suponen la formación de intermedios cargados inestables que tienden a descomponerse rápidamente en sus especies reactivas constituyentes, impidiendo de este modo la reacción **(Fig. 6-8)**. Los intermedios cargados se pueden estabilizar a menudo transfiriendo protones a o desde el sustrato o intermedio para formar una especie que se descompone más fácilmente en productos. Estos protones se transfieren entre un enzima y un sustrato o intermedio.

Los efectos de la catálisis por ácidos y bases se estudian a menudo utilizando reacciones no enzimáticas modelo en las que los dadores o aceptores de protones son los constituyentes del agua sola o bien otros ácidos o bases débiles. La catálisis que sólo utiliza los iones H^+ (H_3O^+) u OH^- presentes en el agua se denomina **catálisis ácida o básica específica**. Si la transferencia de protones entre el intermedio y el agua es más rápida que la descomposición del intermedio en reactivos, el intermedio se estabiliza de manera efectiva cada vez que se forma. En este caso no se producirá catálisis adicional facilitada por otros aceptores o dadores de protones. No obstante, en muchos casos el agua no es suficiente para impedir la descomposición en reactivos. En estos casos de reacciones no enzimáticas en solución acuosa se pueden añadir ácidos y bases débiles para acelerar la velocidad de reacción. No se producirá una catálisis adicional debida a otros dadores o aceptores de protones. Muchos ácidos orgánicos débiles pueden

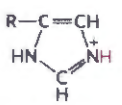
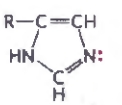
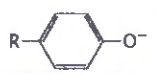
Residuos aminoácidos	Forma ácida general (dador de protones)	Forma básica general (aceptor de protones)
Glu, Asp	R—COOH	R—COO^-
Lys, Arg	R—$\overset{+}{N}H_3$	R—NH_2
Cys	R—SH	R—S^-
His		
Ser	R—OH	R—O^-
Tyr		

FIGURA 6-9 Aminoácidos involucrados en la catálisis ácido-base general. Muchas reacciones orgánicas utilizadas como modelo de procesos bioquímicos están favorecidas por dadores de protones (ácidos generales) o aceptores de protones (bases generales). Los sitios activos de algunos enzimas contienen grupos funcionales de aminoácidos, tales como los que aquí se muestran, que pueden participar en el proceso catalítico como dadores o aceptores de protones.

suplementar al agua como dadores de protones en esta situación, del mismo modo que bases orgánicas débiles pueden servir como aceptores de protones. El término **catálisis ácido-base general** hace referencia a las transferencias de protones facilitadas por ácidos y bases débiles que no son el agua.

En el sitio activo de un enzima, en donde puede que el agua no esté disponible como dador o aceptor de protones, la catálisis ácido-base general adquiere gran importancia. Varias cadenas laterales de aminoácidos pueden, y de hecho actúan, como dadores y aceptores de protones **(Fig. 6-9)**. Estos grupos se pueden posicionar de forma precisa en el sitio activo de un enzima para permitir la transferencia de protones, generando incrementos de velocidad del orden de 10^2 a 10^5. Este tipo de catálisis tiene lugar en la gran mayoría de los enzimas.

Catálisis covalente En la catálisis covalente se forma un enlace covalente transitorio entre el enzima y el sustrato. Consideremos la hidrólisis de un enlace entre los grupos A y B:

$$A{-}B \xrightarrow{H_2O} A + B$$

En presencia de un catalizador covalente (un enzima con un grupo nucleofílico X:) la reacción se transforma en

$$A{-}B + X: \longrightarrow A{-}X + B \xrightarrow{H_2O} A + X: + B$$

La formación y descomposición de un intermedio covalente crea una nueva ruta para la reacción pero *sólo* produce catálisis si la nueva ruta tiene una energía de activación inferior que la ruta no catalizada. Los dos nuevos pasos han de ser más rápidos que la reacción no catalizada. Diversas cadenas laterales de aminoácidos, entre las que se cuentan todas las de la Fig. 6-9, así como los grupos funcionales de algunos cofactores enzimáticos, sirven como nucleófilos para la formación de enlaces covalentes con los sustratos. Estos complejos covalentes siempre experimentan una reacción adicional con el fin de regenerar el enzima libre. El enlace covalente formado entre el enzima y el sustrato puede activar un sustrato para una nueva reacción de una forma que es normalmente específica para el grupo o coenzima implicado.

Catálisis por iones metálicos Los metales, tanto si están fuertemente unidos al enzima o son captados de la solución junto con el sustrato, pueden participar de diferentes maneras en la catálisis. Interacciones iónicas entre un metal fijado al enzima y el sustrato pueden ayudar a orientar a un sustrato para que reaccione o estabilizar estados de transición de la reacción que estén cargados. Esta utilización de interacciones de fijación débiles entre el metal y el sustrato es similar a algunos de los usos de la energía de fijación enzima-sustrato descrita anteriormente. Los metales también pueden facilitar reacciones de oxidación-reducción mediante cambios reversibles en el estado de oxidación del ión metálico. Casi una tercera parte de los enzimas conocidos requieren uno o más iones metálicos para su actividad catalítica.

La mayoría de enzimas utilizan una combinación de varias estrategias catalíticas para conseguir un incremento de velocidad. Un buen ejemplo de ello es la utilización de la catálisis covalente, catálisis ácido-base general y estabilización del estado de transición en la reacción catalizada por la quimotripsina descrita con mayor detalle en la Sección 6.4.

RESUMEN 6.2 Funcionamiento de los enzimas

- Los enzimas son catalizadores muy eficientes, capaces de aumentar las velocidades de reacción en un factor de entre 10^5 y 10^{17}.
- Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan por la formación de un complejo entre el sustrato y el enzima (complejo ES). La fijación del sustrato se produce en una bolsa del enzima llamada sitio activo.
- La función de los enzimas y de otros catalizadores consiste en disminuir la energía de activación, $\Delta G^{\ddagger}$, de una reacción con el fin de incrementar su velocidad de reacción. El equilibrio de una reacción no se ve afectado por el enzima.
- Una parte significativa de la energía utilizada para el incremento de la velocidad de las reacciones enzimáticas proviene de las interacciones débiles (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas) entre enzima y sustrato. El sitio activo del enzima tiene una estructura tal que hace que algunas de estas interacciones débiles tengan lugar de modo preferente en el estado de transición de la reacción, con lo que lo estabilizan. Una de las razones del gran tamaño de los enzimas es la necesidad de que existan múltiples interacciones. La energía de fijación, ΔG_B, se utiliza para compensar la energía de activación requerida, $\Delta G^{\ddagger}$, de diversas maneras. Puede utilizarse, por ejemplo, para disminuir la entropía del sustrato, desolvatarlo o para producir un cambio de conformación en el enzima (encaje inducido). La energía de fijación es también la responsable de la exquisita especificidad de los enzimas hacia sus sustratos.
- La necesidad de que hayan múltiples interacciones es una de las razones del gran tamaño de los enzimas. La energía de fijación, ΔG_B, se utiliza para compensar, de diversas maneras, la energía requerida para la activación $\Delta G^{\ddagger}$, disminuyendo, por ejemplo, la entropía del sustrato dando lugar a la desolvatación del sustrato, o mediante un cambio conformacional en el enzima (encaje inducido). La energía de fijación también explica la exquisita especificidad de los enzimas coin respecto a sus sustratos.
- Entre los mecanismos catalíticos adicionales empleados por los enzimas se cuentan la catálisis ácido-base general, la catálisis covalente y la catálisis por iones metálicos. La catálisis suele implicar la existencia de interacciones covalentes transitorias entre el sustrato y el enzima, o transferencias de grupos desde o al enzima, con el fin de adoptar un camino de reacción nuevo y de menor energía. En todos los casos, el enzima vuelve a adquirir el estado no ligado una vez se ha completado la reacción.

6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

Los bioquímicos utilizan normalmente diversos métodos para estudiar el mecanismo de acción de enzimas purificados. La estructura tridimensional de la proteína

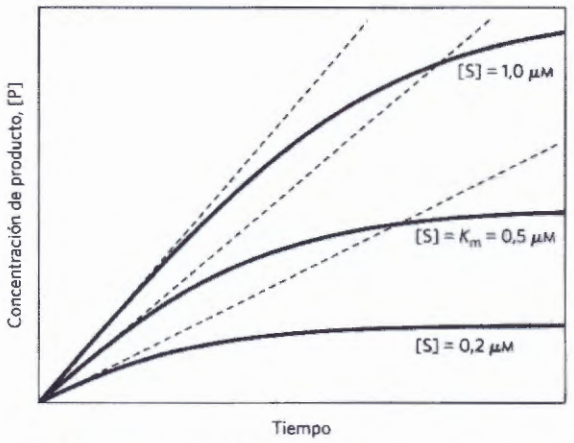


FIGURA 6-10 Velocidades iniciales de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Un enzima hipotético cataliza la reacción S D P, y se encuentra presente a una concentración suficiente para catalizar la reacción a la velocidad máxima, V_{max}, de 1 μM/min. La constante de Michaelis K_m (explicada en el texto), es de 0,5 μM. Se muestran las curvas de progreso para concentraciones de sustrato por debajo de la K_m, del valor de la K_m y por encima del mismo. La velocidad de la reacción catalizada por el enzima desciende al irse convirtiendo el sustrato en producto. La tangente de cada curva tomada a tiempo = 0 define la velocidad inicial, V_0, de cada reacción.

proporciona información importante, que se puede completar con la obtenida por la química de proteínas clásica y por los métodos modernos de mutagénesis dirigida (el cambio de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante ingeniería genética; véase la Fig. 9-10). Estas tecnologías permiten a los enzimólogos examinar el papel de aminoácidos concretos en la estructura y en la acción del enzima. No obstante, el método más antiguo para estudiar mecanismos de reacción enzimáticos, que continúa siendo el más importante, consiste en la determinación de la *velocidad* de la reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales, disciplina que se conoce como **cinética enzimática**. A continuación se expone una introducción básica a la cinética de las reacciones catalizadas por enzimas.

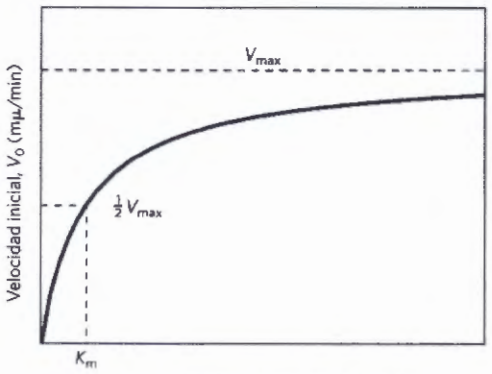


FIGURA 6-11 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por un enzima. En una gráfica de este tipo se puede obtener V_{max} por extrapolación debido a que V_0 se acercará pero nunca alcanzará V_{max}. La concentración de sustrato a la que V_0 es la mitad de la máxima es K_m, la constante de Michaelis-Menten. En un experimento de este tipo la concentración de enzima es generalmente tan baja que [S] >> [E] incluso cuando [S] se describe como baja o relativamente baja. Las unidades reseñadas son típicas de las reacciones catalizadas por enzimas y sólo se muestran aquí para ayudar a ilustrar el significado de V_0 y [S]. (Obsérvese que la curva describe *parte* de una hipérbola rectangular con una asíntota en V_{max}. Si se continuase la curva por debajo de [S] = 0 se aproximaría a una asíntota vertical a [S] = - K_m).

La concentración de sustrato afecta a la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas

Uno de los factores clave que afectan la velocidad de una reacción catalizada por un enzima es la concentración de sustrato presente, [S]. Sin embargo, el estudio de los efectos de la concentración de sustrato es complicado debido al hecho de que [S] cambia durante el transcurso de una reacción in vitro a medida que el sustrato se convierte en producto. Una aproximación que sirve para simplificar los experimentos cinéticos consiste en medir la **velocidad inicial**, designada V_0 **(Fig. 6-10)**. En una reacción típica, el enzima puede estar presente en concentraciones del orden nanomolar, mientras que [S] puede ser cinco o seis órdenes de magnitud mayor. Si sólo se toman datos del inicio de la reacción en el que los cambios en [S] se limitan a un pequeño porcentaje y puede considerarse que la concentración permanece constante. A continuación puede explorarse el valor de V_0 en función de [S], valor que es ajustado por el investigador. El efecto de la variación de [S] sobre V_0 cuando se mantiene constante la concentración de enzima se muestra en la **Figura 6-11**. A concentraciones de sustrato relativamente bajas, V_0 aumenta casi linealmente con el incremento de [S]. A mayores concentraciones de sustrato, V_0 aumenta a incrementos cada vez menores en respuesta a incrementos de [S]. Finalmente, se alcanza un punto más allá del cual se dan incrementos pequeñísimos de V_0 a medida que aumenta [S]. Esta meseta se denomina **velocidad máxima, V_{max}**.

El complejo ES constituye la clave para entender el comportamiento cinético, del mismo modo que representó un punto de partida para la discusión de la catálisis. El patrón cinético de la Figura 6-11 hizo que Victor Henri, bajo la dirección de Wurtz, propusiese en 1903 que la combinación de un enzima con su molécula de sustrato para formar el complejo ES es un paso necesario en la catálisis enzimática. Esta idea fue ampliada para dar lugar a una teoría general de la acción enzimática, en particular a cargo de Leonor Michaelis y Maud



Leonor Michaelis, 1875-1949 [Fuente: Rockefeller Archive Center.]



Maud Menten, 1879-1960 [Fuente: Cortesía de Archives Service Center, University of Pittsburgh.]

Menten en 1913. Postularon que el enzima se combina en primer lugar de forma reversible con su sustrato formando un complejo enzima-sustrato en un paso reversible relativamente rápido:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (6\text{-}7)$$

El complejo ES se descompone seguidamente en un segundo paso más lento dando el enzima libre y el producto de la reacción P:

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (6\text{-}8)$$

Puesto que la segunda reacción (Ecn. 6-8) es la más lenta ha de limitar, por tanto, la velocidad de la reacción global, que ha de ser proporcional a la concentración de la especie que reacciona en el segundo paso, es decir, ES.

En cualquier momento de una reacción catalizada por un enzima, éste existe en dos formas, la forma libre o sin combinar E y la forma combinada ES. A baja [S], la mayor parte del enzima estará en la forma sin combinar E. Aquí la velocidad será proporcional a [S] porque el equilibrio de la ecuación 6-7 será empujado hacia la formación de más ES a medida que [S] aumenta. La velocidad inicial máxima de la reacción catalizada (V_{max}) se observará cuando virtualmente todo el enzima esté en forma de complejo ES y la concentración de E sea extremadamente pequeña. En estas condiciones, el enzima está "saturado" con su sustrato de modo que el aumento adicional de [S] no tendrá efecto sobre la velocidad. Esta condición se producirá cuando [S] sea lo suficientemente alta como para que todo el enzima libre se haya convertido en la forma ES. Cuando el complejo ES se descompone dando el producto P, el enzima queda libre para catalizar la reacción con otra molécula de sustrato (cosa que hará rápidamente en condiciones de saturación). El efecto de saturación es una característica distintiva de la catálisis enzimática y es el responsable de la meseta observada en la Figura 6-11. El patrón observado en la Figura 6-11 recibe en ocasiones el nombre de cinética de saturación.

Cuando el enzima se mezcla inicialmente con un gran exceso de sustrato, existe un período inicial, denominado **estado pre-estacionario**, durante el cual aumenta la concentración del complejo ES. En muchas reacciones enzimáticas este período es muy breve. Normalmente es demasiado corto para que sea observado fácilmente y dura tan sólo unos microsegundos por lo que no aparece en la Figura 6-10. (Volveremos al estado pre-estacionario más adelante en esta sección). La reacción alcanza rápidamente un **estado estacionario** en el que [ES] (y la concentración de cualquier otro intermedio) permanece aproximadamente constante con el tiempo. El concepto de estado estacionario fue presentado por G.E. Briggs y Haldane en 1925 es una aproximación basada en una realidad sencilla. Tal como se ha mencionado anteriormente, los enzimas son catalizadores poderosos que se encuentran, en general, a concentraciones que son órdenes de magnitud inferiores a la concentración de sustrato. Una vez transcurrida la fase efímera del estado pre-estacionario (frecuentemente después de un solo ciclo enzimático; esto es, la conversión de una molécula de sustrato en una de producto por cada molécula de enzima), P se genera a la misma velocidad que se consume S sólo si la concentración del intermedio ES permanece estacionaria. La V_0 medida refleja generalmente el estado estacionario, aún cuando V_0 se limite a los primeros instantes de la reacción; el análisis de las velocidades iniciales se conoce como **cinética del estado estacionario**.

La relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción enzimática se puede expresar de manera cuantitativa

La curva que representa la relación entre [S] y V_0 (Fig. 6-11) tiene la misma forma general para la mayoría de enzimas (se acerca a una hipérbola rectangular), y se puede expresar algebraicamente mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Estos investigadores dedujeron esta ecuación a partir de su hipótesis básica de que el paso limitante de velocidad en las reacciones enzimáticas es la descomposición del complejo ES para formar el producto y el enzima libre. La ecuación es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{-}9)$$

Los términos importantes son [S], V_0, V_{max} y una constante llamada constante de Michaelis o K_m. Todos estos términos se pueden medir fácilmente de manera experimental.

Aquí desarrollaremos los pasos lógicos y algebraicos básicos para plantear una deducción moderna de la ecuación de Michaelis-Menten que asume la existencia del estado estacionario introducida por Briggs y Haldane. La deducción se inicia con las dos reacciones básicas que intervienen en la formación y descomposición de ES (Ecns. 6-7 y 6-8). En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto, [P], es despreciable y se contempla la simplificación de que puede ignorarse la reacción inversa P → S (descrita por k_{-2}). Esta suposición no introduce distorsiones críticas y simplifica nuestra tarea. La reacción global se reduce a

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (6\text{-}10)$$

V_0 viene determinada por la descomposición de ES para dar producto, que viene fijada por [ES]:

$$V_0 = k_2[ES] \qquad (6\text{-}11)$$

Dado que [ES] de la Ecuación 6-11 no se puede medir experimentalmente con facilidad, hemos de empezar por encontrar una expresión alternativa para este término. En primer lugar introduciremos el término $[E_t]$ que representa la concentración total de enzima (la suma de enzima libre y enzima unido al sustrato). El enzima libre, o no fijado, se puede representar, por tanto, como $[E_t]$-[ES]. Además, debido a que [S] es ordinariamente mucho mayor que $[E_t]$, la cantidad de sustrato fijada por el enzima en cualquier momento de la reacción es despreciable comparado con la [S] total. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los pasos siguientes nos conducirán a una expresión de V_0 en función de parámetros que se miden fácilmente.

Paso 1. Las velocidades de formación y descomposición de ES vienen determinadas por las constantes de veloci-

dad k_1 (formación) y $k_{-1} + k_2$ (descomposición a reactivos y productos, respectivamente), según las expresiones:

Velocidad de formación de ES =

$$k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (6\text{-}12)$$

Velocidad de descomposición de ES =

$$k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6\text{-}13)$$

Paso 2. Damos ahora por supuesta una importante consideración: que la velocidad inicial de reacción refleja un estado estacionario en el que [ES] es constante, es decir, la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de descomposición. A esto se le denomina **hipótesis del estado estacionario**. Las expresiones de las Ecuaciones 6-12 y 6-13 pueden igualarse en el estado estacionario dando:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6\text{-}14)$$

Paso 3. Se realiza una serie de pasos algebraicos para resolver la Ecuación 6-14 en función de [ES]. Se efectúa la multiplicación de la parte izquierda de la igualdad y se simplifica la derecha dando

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6\text{-}15)$$

Sumando el término $k_1[ES][S]$ a ambos lados de la ecuación y simplificando da

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6\text{-}16)$$

Despejando [ES] se obtiene:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (6\text{-}17)$$

Esta expresión aún se puede simplificar más de forma que se combinen todas las constantes de velocidad en una expresión:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \quad (6\text{-}18)$$

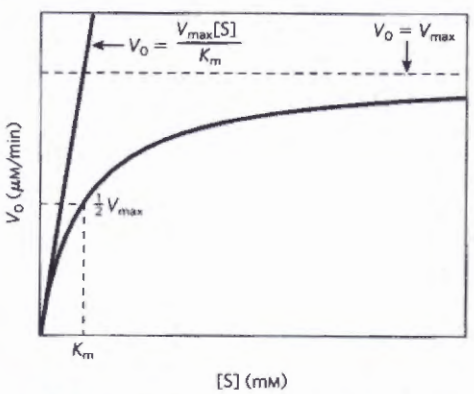


FIGURA 6-12 Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración de sustrato. En el gráfico se muestran los parámetros cinéticos que definen los límites de la curva a [S] alta y baja. A baja [S], $K_m >>$ [S], por lo que el término [S] del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecn. 6-9) es insignificante; la ecuación se simplifica a $V_0 = V_{max}[S]/K_m$ y V_0 tiene una dependencia lineal con respecto a [S] tal como se observa. A alta [S], en donde [S] >> K_m, el término K_m del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten es insignificante, simplificándose la reacción a $V_0 = V_{max}$; esto está de acuerdo con la meseta que se observa a [S] elevada. La ecuación de Michaelis-Menten es, pues, congruente con la dependencia observada de V_0 con respecto a [S], y la forma de la curva está definida por los términos V_{max}/K_m a baja [S] y V_{max} a alta [S].

El término $(k_{-1} + k_2)/k_1$ se define como la **constante de Michaelis-Menten**, K_m. Sustituyéndola ahora en la Ecuación 6-18 la expresión se simplifica a

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (6\text{-}19)$$

Paso 4. Ahora podemos expresar V_0 en función de [ES]. Sustituyendo [ES] en la Ecuación 6-11 por el lado derecho de la ecuación 6-19, obtenemos

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (6\text{-}20)$$

Esta ecuación aún se puede simplificar más. Dado que la velocidad máxima se obtendrá cuando el enzima está saturado (es decir, cuando [ES] = [Et]), V_{max} se puede definir como k_2[Et]. Sustituyendo esto en la Ecuación 6-20 da la Ecuación 6-9:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta es la **ecuación de Michaelis-Menten**, la **ecuación de velocidad** de una reacción catalizada enzimáticamente con un sustrato. Es una definición de la relación cuantitativa entre la velocidad inicial V_0, la velocidad máxima V_{max} y la concentración inicial de sustrato [S], todos ellos relacionados a través de la constante de Michaelis, K_m. Obsérvese que K_m tiene unidades de concentración molar. ¿Se ajusta esta ecuación a los hechos? Sí, podemos confirmarlo considerando las situaciones límite donde [S] es muy alta o muy baja, tal como muestra la **Figura 6-12**.

De la ecuación de Michaelis-Menten emerge una relación numérica importante en el caso especial en que V_0 es exactamente la mitad de V_{max} (Fig. 6-12). En ese caso

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (6\text{-}21)$$

Al dividir por V_{max} obtenemos

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (6\text{-}22)$$

Despejando K_m, obtenemos $K_m + [S] = 2[S]$, o $K_m = [S]$, cuando $V_0 = ½ V_{max}$

$$K_m = [S], \quad \text{when} \quad V_0 = ½V_{max} \quad (6\text{-}23)$$

Ésta es una definición práctica muy útil de K_m: K_m es equivalente a la concentración de sustrato a la cual V_0 es la mitad de V_{max}.

La ecuación de Michaelis-Menten (Ecn 6-9) puede transformarse algebraicamente en formas que son útiles para la determinación práctica de K_m y V_{max} (Recuadro 6-1) y, tal como describiremos más adelante, en el análisis de la acción de los inhibidores (véase el Recuadro 6-2 en la página 209).

Los parámetros cinéticos se utilizan para comparar actividades enzimáticas

Es importante distinguir entre la ecuación de Michaelis-Menten y el mecanismo cinético específico sobre el que se basó originalmente. La ecuación describe el comportamiento cinético de muchos enzimas, diciéndose de todos los enzimas que muestran una dependencia hiper-

RECUADRO 6-1 Métodos para determinar la estructura tridimensional de una proteína

La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales. Una transformación común se obtiene tomando simplemente los inversos en ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten, dando lugar a:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

Separando los componentes del numerador en el segundo miembro de la ecuación da

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

que se simplifica a

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Esta forma de la ecuación de Michaelis-Menten se denomina **ecuación de Lineweaver-Burk**. Para los enzimas que obedecen la relación de Michaelis-Menten la gráfica de $1/V_0$ frente a 1/[S] (el "doble recíproco" de la gráfica de V_0 frente a [S] que hemos utilizado hasta este momento) da una línea recta (Fig. 1). Esta línea tiene una pendiente igual a K_m/V_{max}, la intersección sobre el eje $1/V_0$ es $1/V_{max}$, y la intersección sobre el eje 1/[S] es igual a $-1/K_m$. La presentación doble recíproca, también denominada gráfica de Lineweaver-Burk, tiene la gran ventaja de permitir una determinación mucho más precisa de V_{max}, la cual sólo puede ser obtenida *aproximadamente* a partir de una gráfica simple de V_0 frente [S] (véase la Fig. 6-12).

Se han deducido y utilizado otras transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten. Cada una de ellas tiene alguna ventaja al analizar los datos cinéticos enzimáticos. (Véase el problema 16 al final del capítulo).

La gráfica de los dobles recíprocos de las velocidades de reacción enzimáticas es muy útil para distinguir entre ciertos tipos de mecanismos de reacción enzimáticos (véase la Fig. 6-14) y para analizar la inhibición enzimática (véase el Recuadro 6-2).

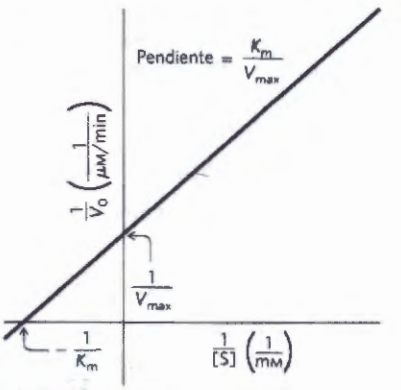


FIGURA 1 Gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk.

bólica de V_0 frente a [S] que siguen una **cinética de Michaelis-Menten**. La regla práctica de que K_m = [S] cuando $V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$ (Ecn. 6-23) es válida para todos los enzimas que siguen la cinética de Michaelis-Menten. (Las principales excepciones a la cinética de Michaelis-Menten son los enzimas reguladores, que se discuten en la Sección 6.5.) Sin embargo, la ecuación de Michaelis-Menten no depende del mecanismo relativamente sencillo de dos pasos propuesto por Michaelis y Menten (Ecn. 6-10). Muchos enzimas que siguen cinética de Michaelis-Menten tienen mecanismos de reacción muy diferentes y enzimas que catalizan reacciones con seis u ocho pasos identificables muestran, a menudo, el mismo comportamiento cinético en el estado estacionario. Aunque la ecuación 6-23 es válida para muchos enzimas, tanto la magnitud como el significado real de V_{max} y de K_m pueden cambiar de un enzima a otro. Ésta es una limitación importante de la aproximación del estado estacionario a la cinética enzimática. V_{max} y K_m son parámetros que se pueden obtener experimentalmente para cualquier enzima, pero que por sí mismos proporcionan muy poca información acerca del número, velocidad o naturaleza química de cada uno de los pasos discretos en la reacción. La cinética del estado estacionario representa, no obstante, el lenguaje estándar mediante el cual se caracterizan y comparan las eficacias catalíticas de los enzimas.

TABLA 6-6 K_m de algunos enzimas y sustratos

Enzima	Sustrato	K_m (mM)
Hexoquinasa (cerebro)	ATP	0,4
	D-Glucosa	0,05
	D-Fructosa	1,5
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosinilglicina	108
	N-Benzoiltirosinamida	2,5
β-Galactosidasa	D-Lactosa	4,0
Treonina deshidratasa	L-Treonina	5,0

Interpretación de V_{max} y de K_m En la Figura 6-12 se muestra un método gráfico sencillo para obtener un valor aproximado de K_m. En el Recuadro 6-1 se presenta un procedimiento más práctico, utilizando una **gráfica doble recíproca**. K_m puede variar considerablemente de un enzima a otro, incluso para diferentes sustratos del mismo enzima (Tabla 6-6). A veces el término se utiliza (a menudo de forma inadecuada) como una indicación de la afinidad de un enzima por su sustrato. El significado real de K_m depende de aspectos específicos del mecanismo de

TABLA 6-7 Números de recambio (k_{cat}) de algunos enzimas

Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalasa	H_2O_2	40.000.000
Carbónico anhidrasa	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	14.000
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	2.000
Fumarasa	Fumarato	800
Proteína RecA (una ATPasa)	ATP	0,5

reacción tales como el número y velocidades relativas de los pasos individuales de la reacción. Para reacciones de dos pasos,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \qquad (6\text{-}24)$$

Cuando k_2 es limitante de velocidad, $k_2 << k_{-1}$ por lo que K_m se simplifica a k_{-1}/k_1 que se define como **constante de disociación**, K_d, del complejo ES. Cuando se dan estas condiciones, K_m representa una medida de la afinidad del enzima por su sustrato en el complejo ES. Sin embargo, esta situación no es válida para la mayoría de enzimas. A veces, $k_2 >> k_{-1}$ por lo que $K_m = k_2/k_1$. En otros casos k_2 y k_{-1} son comparables por lo que K_m es una función más compleja de las tres constantes de velocidad (Ecn. 6-24). La ecuación de Michaelis-Menten y el comportamiento de saturación característico del enzima continúan siendo válidos, pero K_m no se puede considerar como una medida sencilla de la afinidad por el sustrato. Aún son más comunes los casos en los que la reacción transcurre a través de múltiples pasos después de la formación del complejo ES; en estas condiciones K_m es una función muy compleja de muchas constantes de velocidad.

V_{max} también varía considerablemente de un enzima a otro. Si un enzima reacciona según el mecanismo de Michaelis-Menten de dos pasos, $V_{max} = k_2[E_t]$ en donde k_2 es el paso limitante de velocidad. No obstante, el número de pasos en la reacción y la identidad del paso (o pasos) limitante de velocidad pueden variar de un enzima a otro. Por ejemplo, consideremos la situación, bastante frecuente, en la que la liberación del producto, EP → E + P, es el paso limitante de velocidad. Al inicio de la reacción (cuando la [P]) es baja), se puede describir la reacción completa mediante el esquema

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \xrightarrow{k_3} E + P \qquad (6\text{-}25)$$

En este caso, la mayor parte del enzima se encuentra en la forma EP en condiciones de saturación, con lo que $V_{max} = k_3[E_t]$. Es útil definir una constante de velocidad más general, k_{cat}, para describir la velocidad limitante de cualquier reacción enzimática en condiciones de saturación. Si hay varios pasos en la reacción y uno de ellos es claramente limitante, k_{cat} es equivalente a la constante de velocidad del paso limitante. Para la reacción simple de la Ecuación 6-10, $k_{cat} = k_2$. Para la reacción de la Ecuación 6-25, en la que la liberación de producto es claramente el paso limitante, $k_{cat} = k_3$. Cuando hay varios pasos que son parcialmente limitantes de velocidad, k_{cat} es una función compleja de varias constantes de velocidad que definen cada paso individual de la reacción. En la ecuación de Michaelis-Menten, $k_{cat} = V_{max}/[E_t]$, con lo que la Ecuación 6-9 se transforma en

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{-}26)$$

La constante k_{cat} es una constante de velocidad de primer orden con unidades de tiempos inversos y recibe también el nombre de **número de recambio** (en inglés **turnover number**). Es equivalente al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo y a cargo de una sola molécula de enzima cuando el enzima está saturado con el sustrato. En la Tabla 6-7 se indican los números de recambio de varios enzimas.

Comparación de mecanismos y eficiencias catalíticas Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m son útiles para el estudio y comparación de diversos enzimas tanto si

TABLA 6-8 Enzimas para los que k_{cat}/K_m es próximo al límite controlado por difusión (108 a 109 M-1s-1)

Enzima	Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbónico anhidrasa	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalasa	H_2O_2	4×10^7	$1,1 \times 10^0$	4×10^7
Crotonasa	Crotonil-CoA	$5,7 \times 10x$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarasa	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β-Lactamasa	Bencilpenicilina	$2,0 \times 10x$	2×10^{-5}	1×10^8

Fuente: Fersht, A. (1999), *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company.

sus mecanismos de reacción son sencillos como si son complejos. Cada enzima tiene valores de k_{cat} y de K_m que reflejan el ambiente celular, la concentración de sustrato encontrada normalmente in vivo por el enzima y la química de la reacción catalizada.

Los parámetros k_{cat} y K_m nos permiten también evaluar la eficiencia cinética de los enzimas, pero para este fin no es suficiente cada uno de los parámetros por sí solos. Dos enzimas que catalizan reacciones diferentes pueden tener la misma k_{cat} (número de recambio) y, no obstante, las velocidades de las reacciones sin catalizar pueden ser diferentes, con lo que los incrementos de velocidad producidos por los enzimas pueden variar mucho. Experimentalmente, la K_m de un enzima tiende a ser similar a la concentración celular de su sustrato. Un enzima que actúa sobre un sustrato presente en muy baja concentración en la célula tenderá a tener una K_m inferior que un enzima que actúa sobre un sustrato que es más abundante.

La mejor manera de comparar las eficiencias catalíticas de diferentes enzimas o el recambio de diferentes sustratos por el mismo enzima es mediante la comparación de la relación k_{cat}/K_m para las dos reacciones. Este parámetro, conocido a veces como **constante de especificidad,** es la constante de velocidad para la conversión de E+S a E+P. Cuando [S] << Km, la Ecuación 6-26 se simplifica a

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S] \qquad (6\text{-}27)$$

En este caso V_0 depende de la concentración de dos reactivos, $[E_t]$ y [S]; por tanto, ésta es una ecuación de velocidad de segundo orden y la constante k_{cat}/K_m una constante de velocidad de segundo orden con unidades $M^{-1}s^{-1}$. Existe un límite superior de k_{cat}/K_m, impuesto por la velocidad a la que E y S pueden difundir conjuntamente en una solución acuosa. Este límite controlado por difusión está entre 10^8 y 10^9 $M^{-1}s^{-1}$. Hay muchos enzimas que tienen un valor de k_{cat}/K_m cercano a este límite (Tabla 6-8). Se dice que estos enzimas han alcanzado la perfección catalítica. Obsérvese que valores diferentes de k_{cat} y K_m pueden dar la relación máxima.

EJEMPLO PRÁCTICO 6-1 Determinación de K_m

Se ha descubierto un enzima que cataliza la reacción química

$$\text{TRISTE} \rightleftharpoons \text{FELIZ}$$

Un equipo de entusiastas investigadores se dispone a estudiar el enzima, al que denominan felicidasa. Encuentran que la k_{cat} de la felicidasa es de 600 s^{-1}. Llevan a cabo diversos experimentos.

Cuando $[E_t]$ = 20 nM y [TRISTE] = 40 μM, la velocidad de reacción, V_0, es 9,6 μM s^{-1}. Calcule la K_m para el sustrato TRISTE.

Solución: Conocemos k_{cat}, $[E_t]$ y V_0. Queremos obtener K_m. La Ecuación 6-26, en la que sustituimos la V_{max} de la ecuación de Michaelis-Menten por k_{cat} $[E_t]$, nos resulta útil en este caso. Sustituyendo los valores conocidos en la Ecuación 6-26 podemos determinar K_m,

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1} = \frac{(600\ s^{-1})(0{,}020\ \mu M)(40\ \mu M)}{K_m + 40\ \mu M}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1} = \frac{480\ \mu M^2\ s^{-1}}{K_m + 40\ \mu M}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1}(K_m + 40\ \mu M) = 480\ \mu M^2\ s^{-1}$$

$$K_m + 40\ \mu M = \frac{480\ \mu M^2\ s^{-1}}{9{,}6\ \mu M\ s^{-1}}$$

$$K_m + 40\ \mu M = 50\ \mu M$$

$$K_m = 50\ \mu M - 40\ \mu M$$

$$K_m = 10\ \mu M$$

Una vez haya trabajado con esta ecuación encontrará atajos para resolver problemas como éste. Por ejemplo, se puede calcular la V_{max} sabiendo que $k_{cat}[E_t] = V_{max}$ (600 s^{-1} x 0,020 μM = 12 μM s^{-1} en este caso). Una simple reestructuración de la Ecuación 6-26 dividiendo ambos lados por V_{max} da

$$\frac{V_0}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

De este modo, la relación V_0/V_{max} = 9,6 μM s^{-1}/12 μM s^{-1} = $[S]/(K_m + [S])$. Esto simplifica la resolución de K_m, que da 0,25[S] o sea 10 μM.

EJEMPLO PRÁCTICO 6-2 Determinación de [S]

En otro experimento con la felicidasa en el que se utiliza una $[E_t]$ = 10 nM, la velocidad de reacción, V_0, tiene un valor de 3 μM s^{-1}. ¿Cuál es la [S] usada en este experimento?

Solución: Usando la misma lógica que en el Ejemplo Práctico 6-1, vemos que la V_{max} para esta concentración de enzima es 6 μM s^{-1}. Observe que la V_0 es exactamente la mitad que la V_{max}. Recuerde que K_m es, por definición, igual a la [S] en la que $V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$. Por tanto, la [S] debe ser en este caso igual a la K_m, es decir, 10 μM. Si V_0 tuviera un valor distinto a $\frac{1}{2}V_{max}$, sería más sencillo usar la expresión $V_0/V_{max} = [S]/(K_m + [S])$ para obtener [S].

Muchos enzimas catalizan reacciones en las que intervienen dos o más sustratos

Hemos visto de qué modo la [S] afecta la velocidad de una reacción enzimática sencilla (S → P) en la que hay una sola molécula de sustrato. No obstante, en muchas reacciones enzimáticas, se fijan al enzima dos (o incluso más) moléculas de sustrato diferentes que participan en la reacción Aproximadamente dos tercios de todas las reacciones enzimáticas tienen dos sustratos y dos productos. Generalmente, son reacciones en las que se transfiere un grupo de un sustrato al otro o un sustrato es oxidado mientras que se reduce el otro. Por ejemplo, en la reacción catalizada por la hexoquinasa, el ATP y la glucosa son las moléculas de sustrato y el ADP y la glucosa 6-fosfato los productos:

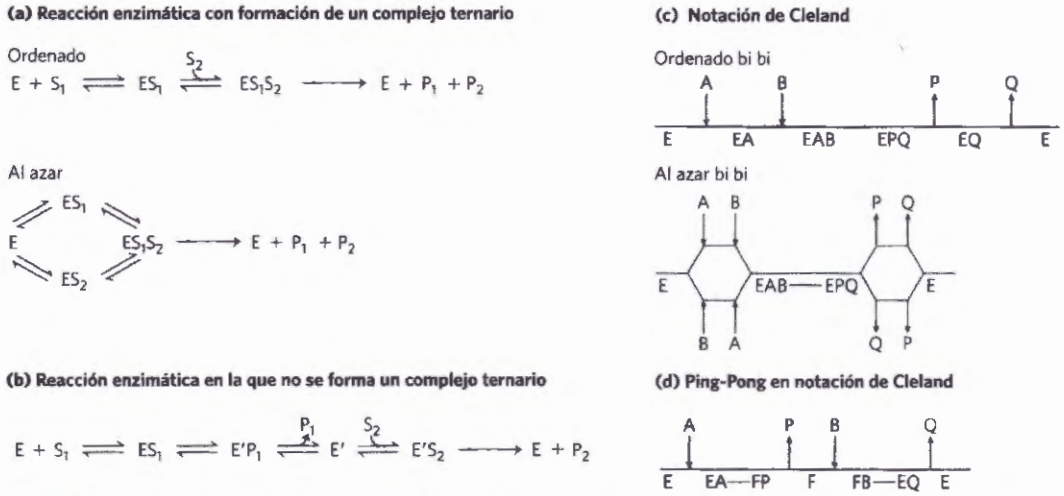


FIGURA 6-13 Mecanismos comunes de las reacciones bisustrato catalizadas enzimáticamente. **(a)** El enzima y ambos sustratos se unen formando un complejo ternario. En la unión ordenada, el sustrato 1 debe unirse antes de que el sustrato 2 se pueda unir de manera productiva. En la unión estadística o al azar, la unión de los sustratos se puede dar en cualquier orden. En **(b)** se forma un complejo enzima-sustrato, un producto abandona el complejo, el enzima modificado forma un segundo complejo con otra molécula de sustrato y sale el segundo producto, regenerando el enzima. El sustrato 1 puede transferir un grupo funcional al enzima (formando *E'* modificado covalentemente) que es posteriormente transferido al sustrato 2. Éste es un mecanismo denominado Ping-Pong o de doble desplazamiento. **(c)** Formación de un complejo ternario utilizando la notación de Cleland. En las reacciones bi bi ordenada y bi bi estadística aquí mostradas, la liberación del producto sigue el mismo patrón que la unión del sustrato: los dos ordenados o los dos estadísticos. **(d)** Reacción Ping-Pong o de doble desplazamiento según la notación de Cleland.

$$\text{ATP} + \text{glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glucosa 6-fosfato}$$

Se transfiere un grupo fosforilo desde el ATP a la glucosa. Las velocidades de tales reacciones bisustrato se pueden analizar según el método de Michaelis-Menten. La hexoquinasa tiene una K_m característica para cada uno de sus sustratos (Tabla 6-6).

Las reacciones enzimáticas en las que hay dos sustratos transcurren por una entre varias rutas diferentes. En algunos casos, ambos sustratos están fijados al enzima al mismo tiempo, formando en algún momento de la reacción un complejo ternario no covalente **(Fig. 6-13a)**; los sustratos pueden fijarse en una secuencia al azar o en un orden específico. En otros casos no se forma complejo ternario cuando el primer sustrato se convierte en producto y se disocia antes de que se una el segundo sustrato. Un ejemplo de esto es el mecanismo Ping-Pong o de doble desplazamiento (Fig. 6-13b).

Una notación abreviada desarrollada por W.W. Cleland puede ser útil en la descripción de reacciones con múltiples sustratos y productos. En este sistema conocido como **nomenclatura de Cleland** los sustratos se denominan A, B, C y D según el orden de unión al enzima mientras que los productos se denominan P, Q, S, T según el orden de disociación. Las reacciones enzimáticas con uno, dos, tres o cuatro sustratos se conocen como uni, bi, ter y quad, respectivamente. El enzima se denota, como siempre, E, pero si se modifica en el transcurso de la reacción, las formas sucesivas se denominan F, G, etc. El progreso de la reacción se indica mediante una línea horizontal, en la que las especies químicas sucesivas se escriben debajo de la misma. Si hay alguna alternativa en la ruta de reacción la línea horizontal se bifurca. Los pasos en donde se produce unión o disociación de sustratos y productos están indicados con líneas verticales. En la Fig. 16-13c se ilustran con la notación abreviada reacciones comunes con dos sustratos y dos productos (bi bi) de tipo bi bi ordenado y bi bi estadístico. En este último caso la liberación de

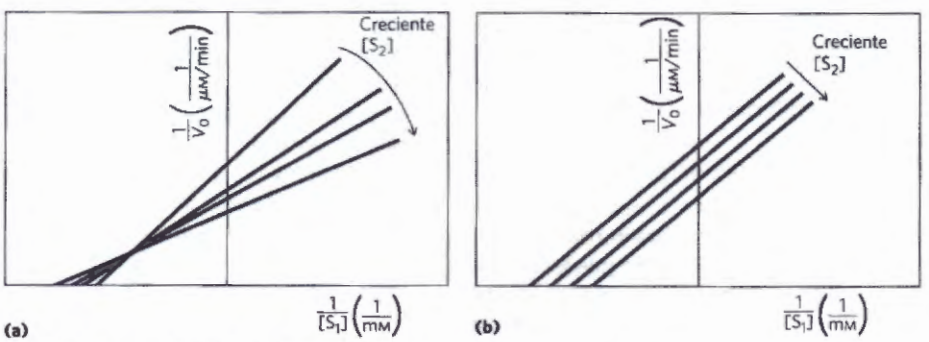


FIGURA 6-14 Análisis cinético en el estado estacionario de las reacciones bisustrato. En estas gráficas de dobles recíprocos (véase el Recuadro 6-1) se varía la concentración del sustrato 1 mientras que se mantiene constante la concentración del sustrato 2. Esto se repite para diversos valores de [S2], con lo que se generan varias líneas separadas. **(a)** Si las líneas se cortan se ha formado un complejo ternario en la reacción; **(b)** si son paralelas, la reacción transcurre a través de una ruta ping-pong o de doble desplazamiento.

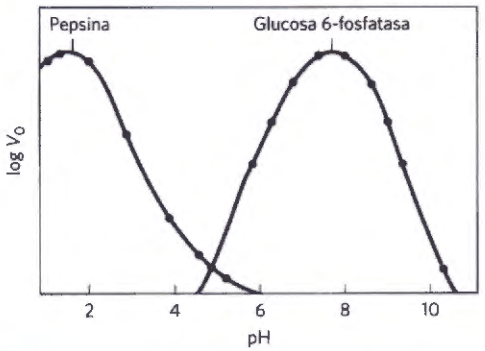


FIGURA 6-15 Perfiles de actividad frente al pH de dos enzimas. Estas curvas se construyen a partir de medidas de las velocidades iniciales cuando la reacción se lleva a cabo en tampones de pH diferentes. Debido a que el pH es una escala logarítmica que expresa cambios de diez veces en [H+], los cambios en V_0 también están representados en escala logarítmica. El pH óptimo de actividad de un enzima es generalmente un reflejo del pH del ambiente celular en el que se encuentra normalmente. La pepsina, que se encuentra en el estómago, tiene un pH óptimo alrededor de 1,6. El pH del jugo gástrico se encuentra entre 1 y 2. La glucosa 6-fosfatasa de los hepatocitos (células del hígado), con un pH óptimo alrededor de 7,8 es responsable de la liberación de glucosa a la sangre. El pH normal del citosol de los hepatocitos está alrededor de 7,2.

productos también es estadística tal como se indica con los dos conjuntos de bifurcaciones. Raras veces la unión de sustratos es ordenada mientras que la liberación de productos es estadística y viceversa, eliminando la bifurcación en un extremo u otro de la línea de progreso. En una reacción Ping-Pong, que carece de complejo ternario, la ruta contiene una segunda forma, transitoria, del enzima, F (Fig. 16-13d). Esta es la forma en la que se ha transferido un grupo del primer sustrato, A, que crea una unión transitoria covalente al enzima. Tal como se ha dicho anteriormente, estas reacciones también se denominan a menudo reacciones de doble desplazamiento ya que primero se transfiere un grupo del sustrato A al enzima y, seguidamente, desde el enzima al sustrato B. Los sustratos A y B no se encuentran entre sí en el enzima.

La cinética de Michaelis-Menten en el estado estacionario sólo puede proporcionar una información limitada sobre el número de pasos e intermedios en una reacción enzimática, pero se puede utilizar para distinguir entre rutas que tienen un intermedio ternario y las que no lo tienen, entre ellas la ruta Ping-Pong **(Fig. 6-14)**. Tal como se verá al estudiar la inhibición enzimática, la cinética en el estado estacionario también puede distinguir entre la unión ordenada o al azar de sustratos y productos en reacciones con intermedios ternarios.

La actividad enzimática depende del pH

En general, la cinética del estado estacionario proporciona información necesaria para caracterizar un enzima y evaluar su eficiencia catalítica. Se puede obtener información adicional examinando de qué modo los parámetros experimentales k_{cat} y k_{cat}/K_m se modifican cuando cambian las condiciones experimentales, especialmente el pH. Los enzimas tienen un pH óptimo, o un intervalo de pH, en el que su actividad es máxima **(Fig. 6-15)**; a valores superiores o inferiores de pH la actividad disminuye. Esto no es sorprendente dado que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima y que dependen del mantenimiento de un cierto estado de ionización, mientras que en otras zonas de la proteína algunas cadenas laterales ionizadas pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantiene la estructura de la proteína. La eliminación de un protón de un residuo His podría, por ejemplo, eliminar una interacción iónica esencial para la estabilización de la conformación activa del enzima. Menos frecuentes son los casos en los que la sensibilidad al pH tenga relación con la titulación de un grupo del sustrato.

El intervalo de pH en el que cambia la actividad del enzima puede proporcionar alguna pista sobre qué tipo de aminoácido está implicado (véase la Tabla 3-1). Por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática cerca de pH 7,0 refleja frecuentemente la titulación de un residuo His. No obstante, el efecto del pH ha de interpretarse con cautela. En el ambiente compacto de una proteína, el pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos puede cambiar significativamente. Por ejemplo, una carga positiva próxima puede disminuir el pK_a de un residuo Lys mientras que la proximidad de una carga negativa puede aumentarlo. Estos efectos dan lugar, en ocasiones, a valores de pK_a que varían en varias unidades en comparación con los de los aminoácidos libres. Por ejemplo, en el enzima acetoacetato descarboxilasa hay un residuo Lys que tiene un pK_a de 6,6 (el normal en la lisina libre es de 10,5) debido a efectos electrostáticos de cargas positivas cercanas

La cinética del estado pre-estacionario puede aportar pruebas sobre pasos específicos de la reacción

Los conocimientos mecanísticos proporcionados por la cinética en el estado estacionario se pueden aumentar, a veces de manera espectacular, examinando el estado pre-estacionario. Consideremos un enzima con un mecanismo de reacción que está de acuerdo con la Ecuación 6-25, en la que hay tres pasos

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \xrightarrow{k_3} E + P$$

La eficiencia catalítica global de esta reacción se puede evaluar mediante cinética en el estado estacionario, si bien la velocidad de los diferentes pasos no puede determinarse de este modo y el paso lento (limitante de velocidad) raramente puede ser identificado. Para medir las constantes de velocidad de los pasos individuales, ha de estudiarse la reacción en el estado pre-estacionario. El primer ciclo de una reacción catalizada por un enzima tiene lugar a menudo en segundos o milisegundos por lo que los investigadores utilizan un utillaje especial que permite mezclar y tomar muestras en esta escala de tiempo **(Fig. 6-16a)**. Se detiene la reacción y se cuantifican los productos unidos a la proteína, después de la adición en el momento preciso de un ácido que desnaturaliza la proteína y libera las moléculas fijadas. La descripción detallada de la cinética en el estado pre-estacionario está fuera del alcance de este texto pero podemos ilustrar la potencia de este enfoque mediante un ejemplo sencillo de un enzima que utiliza

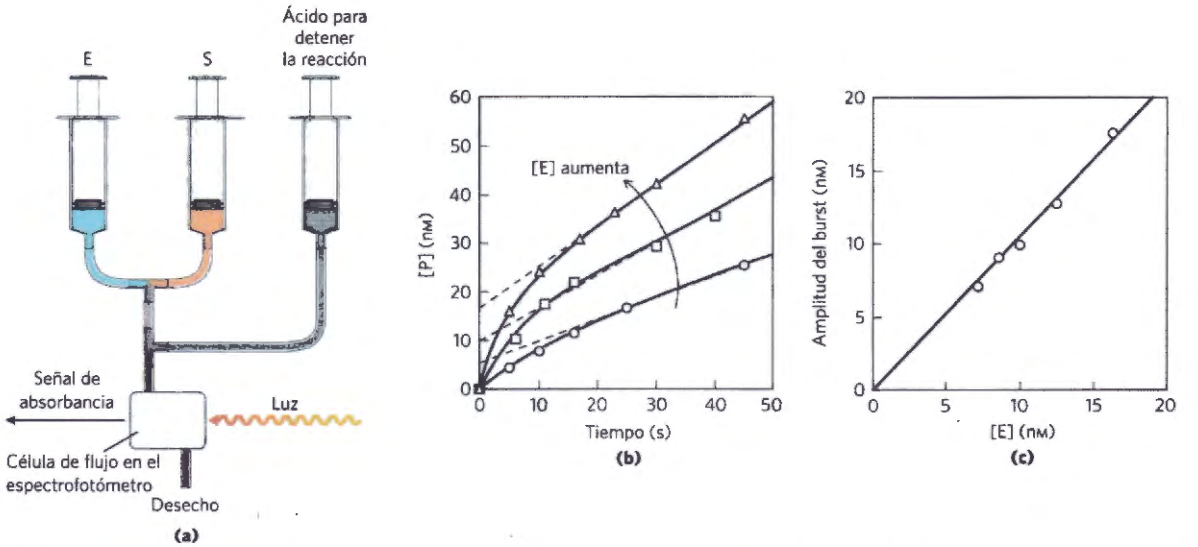


FIGURA 6-16 Cinética en el estado pre-estacionario. La fase efímera que constituye el estado pre-estacionario a menudo existe sólo unos pocos segundos o milisegundos por lo que requiere equipos especializados para seguirla. **(a)** Esquema simplificado de un aparato de mezcla rápida denominada aparato de stopped-flow (flujo detenido). El enzima (E) y el sustrato (S) se mezclan con la ayuda de jeringas manipuladas mecánicamente. La reacción se detiene a un tiempo programado añadiendo un ácido desnaturalizante con otra jeringa y determinándose entonces la cantidad de producto formado, en este caso con un espectrofotómetro. **(b)** Los datos experimentales de una reacción enzimática muestran que el estado pre-estacionario tiene lugar en los primeros 5 a 10 segundos. Ésta es una reacción relativamente lenta y se utiliza como ejemplo porque se puede seguir de manera conveniente el estado estacionario. La pendiente de las líneas después de 15 segundos refleja el estado estacionario. La extrapolación de esta pendiente a tiempo cero (líneas a trazos) dan la amplitud de la fase de burst. El progreso de la reacción durante el estado pre-estacionario refleja principalmente los pasos químicos de la reacción (no se muestran detalles de los mismos). La presencia de un burst o explosión indica que un paso después de la etapa química que produce P es limitante de velocidad (en este caso la liberación de producto). Obsérvese que la intersección de la extrapolación a tiempo = 0 aumenta a medida que aumenta [E]. **(c)** La gráfica de la amplitud del burst (las intersecciones en (b)) frente a [E] muestra que se forma una molécula de P en cada sitio activo durante la fase del burst (estado pre-estacionario). Esto es una prueba de que el paso 3, liberación de producto, es el paso limitante de velocidad ya que es el único paso que sigue a la formación de producto en esta reacción enzimática sencilla. El enzima utilizado en este experimento es la RNasa P uno de los RNA catalíticos descritos en el Capítulo 26 [Fuente: (b,c) Datos de J. Hsieh et al. *RNA* 15:224, 2009.]

la ruta mostrada en la Ecuación 6-25. En este ejemplo también interviene un enzima que cataliza una reacción relativamente lenta, por lo que el estado pre-estacionario se observa de modo más conveniente.

Para muchos enzimas, la disociación del producto es limitante de velocidad. En este ejemplo (Fig. 6-16b, c) la velocidad de disociación del producto (k_3) es más lenta que su velocidad de formación (k_2). Por tanto, la disociación del producto dicta las velocidades observadas en el estado estacionario. ¿Cómo sabemos que k_3 es limitante de velocidad? Una k_3 lenta da lugar a una explosión (burst) de formación de producto en el estado pre-estacionario porque las etapas precedentes son relativamente rápidas. El burst refleja la conversión rápida de una molécula de sustrato en una de producto en cada sitio activo del enzima. La velocidad observada de formación de producto se enlentece a la velocidad del estado estacionario a medida que el producto fijado se libera lentamente. Cada ciclo enzimático después del primero ha de transcurrir a través del paso lento de liberación del producto. No obstante, la rápida generación de producto en aquel primer ciclo proporciona mucha información. La amplitud del burst, cuando se genera una molécula de producto por molécula de enzima presente (Fig. 6-16c) medida por extrapolación de la línea de progreso en el estado estacionario a tiempo cero, es la mayor amplitud posible. Ello constituye una prueba de que la liberación de producto es, desde luego, limitante de velocidad. La constante de velocidad del paso correspondiente a la reacción química, k_2, puede calcularse a partir de la velocidad de la fase correspondiente al burst. Ciertamente, no todos los enzimas actúan siempre según el sencillo esquema de reacción de la Ecuación 6-25. Formalmente, la observación de una explosión indica que después de la formación del producto monitorizada convenientemente existe un paso limitante de velocidad (normalmente la liberación de producto, un cambio conformacional del enzima u otro paso químico). Otros experimentos y análisis adicionales pueden definir, a menudo, las velocidades de cada paso en una reacción enzimática con múltiples pasos. En la descripción de enzimas específicos en la Sección 6-4 se incluyen algunos ejemplos de la aplicación de la cinética del estado pre-estacionario.

Los enzimas están sujetos a inhibición reversible o irreversible

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que interfieren en la catálisis, enlenteciéndola o deteniendo las reacciones enzimáticas. Los enzimas catalizan, prácticamente, todos los procesos celulares por lo que no es sorprendente que los inhibidores enzimáticos se encuentren entre los agentes farmacéuticos conocidos más importantes. Por ejemplo, la aspirina (acetilsalicilato) inhibe el enzima que cataliza el primer paso de la

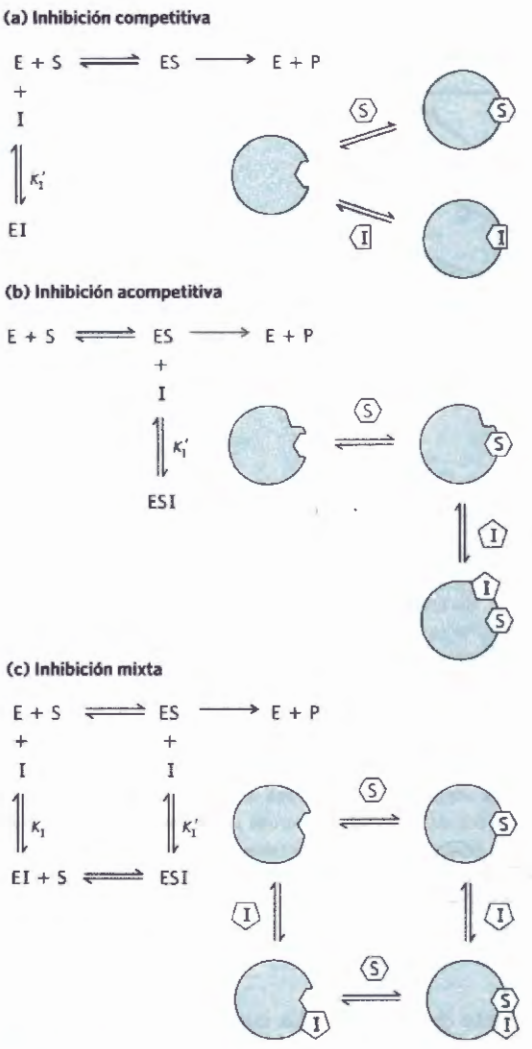


FIGURA 6-17 Tres tipos de inhibición reversible. (a) Los inhibidores competitivos se unen al sitio activo del enzima; K_I es la constante de equilibrio de la unión del inhibidor a E. **(b)** Los inhibidores acompetitivos se fijan en un sitio distinto, pero sólo se unen al complejo ES; K_I' es la constante de equilibrio de unión del inhibidor a ES. **(c)** Los inhibidores mixtos se unen a sitios separados, pero pueden unirse tanto a E como ES.

síntesis de prostaglandinas, compuestos que intervienen en muchos procesos, algunos de los cuales producen dolor. El estudio de los inhibidores enzimáticos también ha proporcionado información valiosa sobre mecanismos enzimáticos y ha ayudado a definir algunas rutas metabólicas. Hay dos amplias clases de inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles.

Inhibición reversible Un tipo de **inhibición reversible** común es la que se denomina **inhibición competitiva (Fig. 6-17a)**. Un **inhibidor competitivo** compite con el sustrato por el sitio activo del enzima. Mientras el inhibidor (I) ocupa el sitio activo impide la fijación del sustrato al enzima. Muchos inhibidores competitivos son estructuralmente similares al sustrato combinándose con el enzima y formando un complejo EI, que no conduce a la catálisis. Incluso combinaciones transitorias de este tipo afectarán negativamente a la eficiencia del enzima. Al considerar la geometría molecular de los inhibidores podemos llegar a menudo a conclusiones sobre qué regiones de un sustrato normal interaccionan con el enzima. La inhibición competitiva se puede analizar cuantitativamente mediante cinética del estado estacionario. En presencia de un inhibidor competitivo, la ecuación de Michaelis-Menten (Ecn 6-9) pasa a ser

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \qquad (6\text{-}28)$$

donde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{y} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

La ecuación 6-28 describe las características importantes de la inhibición competitiva. El término variable αK_m determinado experimentalmente, la K_m observada en presencia de inhibidor, a menudo se denomina K_m "aparente".

El inhibidor unido no inactiva el enzima. Cuando se disocia el inhibidor puede unirse y reaccionar el sustrato. Debido a que el inhibidor se une de manera reversible al enzima, se puede cambiar el sentido de la competición en favor del sustrato simplemente añadiendo más sustrato. Cuando [S] excede sobradamente a [I] se minimiza la probabilidad de que se fije una molécula de inhibidor, por lo que la reacción muestra una V_{max} normal. No obstante, en presencia de inhibidor, se necesitan concentraciones de sustrato mayores para aproximarse a esa V_{max}. La [S] a la cual $V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$, la K_m aparente, aumentará en presencia del inhibidor en un factor α. Este efecto sobre la K_m aparente combinado con la ausencia de efecto sobre la V_{max} es diagnóstico de inhibición competitiva, y se pone de manifiesto fácilmente en una gráfica de dobles recíprocos (Recuadro 6-2). La constante de equilibrio para la fijación del inhibidor, K_I, puede obtenerse a partir de la misma gráfica.

La inhibición competitiva se utiliza en terapia médica para tratar pacientes que han ingerido metanol, disolvente que se utiliza como anticongelante. El enzima hepático alcohol deshidrogenasa convierte el metanol en formaldehido, un compuesto perjudicial para muchos tejidos. La ceguera es frecuentemente el resultado de la ingestión de metanol debido a que los ojos son especialmente sensibles al formaldehido. El etanol compite de manera efectiva con el metanol como sustrato de la alcohol deshidrogenasa. El efecto del etanol es muy parecido al de un inhibidor competitivo, con la distinción de que el etanol también es un sustrato y su concentración disminuirá con el tiempo a medida que el enzima lo convierta en acetaldehído. La terapia para el envenenamiento por metanol es la infusión intravenosa lenta de etanol a una velocidad que mantenga una concentración controlada en el torrente sanguíneo durante varias horas. Esto reduce la tasa de formación de formaldehido, reduciendo el peligro mientras los riñones filtran el metanol que se excretará inocuamente por la orina. ■

Hay otros dos tipos de inhibición reversible, acompetitiva y mixta, que a menudo se definen aplicados a enzimas con un solo sustrato pero que en la práctica sólo se observan con enzimas que actúan con dos o más sustratos. Un **inhibidor acompetitivo** (Fig. 6-15b) es el que se fija a un sitio distinto del que se fija el sustrato

RECUADRO 6-2 Pruebas cinéticas para determinar los mecanismos de inhibición

La gráfica de los dobles recíprocos (véase el Recuadro 6-1) ofrece una forma fácil de determinar si un inhibidor enzimático es competitivo, acompetitivo o mixto. Se llevan a cabo dos grupos de experimentos de velocidad en los que la concentración de enzima se mantiene constante en cada grupo. En el primer grupo [S] también se mantiene constante, lo que permite medir el efecto del incremento de la concentración de inhibidor [I] sobre la velocidad inicial V_0 (no se muestra en la figura). En el segundo grupo [I] se mantiene constante y se varía [S]. En la gráfica de dobles recíprocos se representa $1/V_0$ frente a 1/[S].

La Figura 1 muestra un conjunto de gráficas de dobles recíprocos obtenidas en ausencia de inhibidor y a dos concentraciones diferentes de un inhibidor competitivo. El incremento de [I] da lugar a la producción de una familia de líneas con una intersección común en el eje $1/V_0$ pero con pendientes diferentes. Debido a que la intersección sobre el eje $1/V_0$ es igual a $1/V_{max}$, podemos ver que V_{max} no cambia en presencia del inhibidor competitivo. Es decir, independientemente de la concentración de un inhibidor competitivo, hay siempre una concentración de sustrato suficientemente elevada para desplazar al inhibidor del sitio activo del enzima. Encima de la gráfica se muestra la reordenación de la Ecuación 6-28 en la que se basa la representación. Se puede calcular el valor de α a partir del cambio de pendiente para cualquier valor de [I]. Conociendo [I] y α, se puede *calcular* K_I partir de la expresión

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

En la inhibición acompetitiva y mixta, representaciones similares de los datos de velocidad dan las familias de líneas que se ven en las Figuras 2 y 3. Los cambios en los puntos de intersección con los ejes indican cambios en V_{max} y K_m.

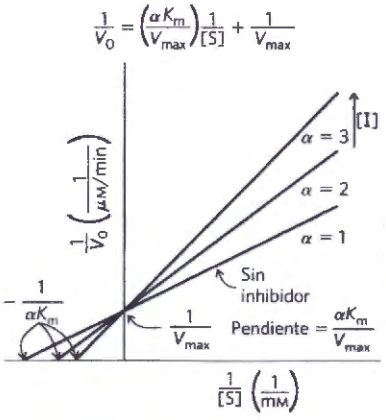


FIGURA 1 Inhibición competitiva

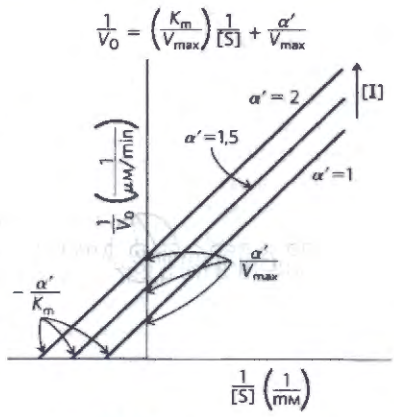


FIGURA 2 Inhibición acompetitiva

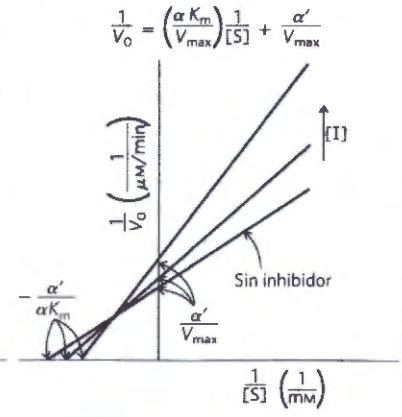


FIGURA 3 Inhibición mixta

en el sitio activo y que, a diferencia del inhibidor competitivo, sólo se une al complejo ES. En presencia de un inhibidor acompetitivo, la ecuación de Michaelis-Menten cambia a

$$V_0 + \frac{V_{max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \qquad (6\text{-}29)$$

donde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'} \quad \text{y} \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Como se describe en la Ecuación 6-29, a elevadas concentraciones de sustrato, V_0 se aproxima a V_{max}/α'. Así, un inhibidor acompetitivo disminuye la V_{max} observada. La K_m aparente también disminuye debido a que la [S] necesaria para alcanzar la mitad de la V_{max} disminuye en un factor α'. Este comportamiento puede explicarse de la manera siguiente. Dado que el enzima es inactivo cuando se halla unido el inhibidor incompetitivo, pero el inhibidor no compite con el sustrato para su fijación, el inhibidor elimina de manera efectiva de la reacción una fracción de las moléculas enzimáticas. Debido a que V_{max} depende de [E], la V_{max} observada disminuye y dado que el inhibidor sólo se une al complejo ES sólo ES (no el enzima libre) se elimina de la reacción por lo que la [S] necesaria para alcanzar $\frac{1}{2}V_{max}$, es decir K_m, disminuye en la misma cantidad.

Un **inhibidor mixto** (Fig. 6-17c) también se fija a un sitio distinto al sustrato, pero se fija tanto a E como a ES. La ecuación de velocidad que describe a la inhibición mixta es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \qquad (6\text{-}30)$$

TABLA 6-9 Efectos de inhibidores reversibles sobre los valores de V_{max} aparente y de K_m aparente

Tipo de inhibidor	V_{max} Aparente	K_m Aparente
Ninguno	V_{max}	K_m
Competitivo	V_{max}	αK_m
Acompetitivo	V_{max}/α'	K_m/α'
Mixto	V_{max}/α'	$\alpha K_m/\alpha'$

donde α y α' se definen igual que anteriormente. Normalmente, un inhibidor mixto afecta tanto a K_m como a V_{max}. V_{max} queda afectada porque el inhibidor hace que una parte de las moléculas de enzima asequibles sean inactivas disminuyendo la [E] efectivas de la que depende V_{max}. La K_m puede aumentar o disminuir según sea la forma del enzima, E o ES, a la cual se una más fuertemente el inhibidor. El caso especial en que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado en la práctica, se define clásicamente como **inhibición no competitiva**. Examine la Ecuación 6-30 para ver por qué un inhibidor no competitivo afectaría a V_{max} pero no a K_m.

La ecuación 6-30 se utiliza como una expresión general de los efectos de los inhibidores reversibles, quedando simplificada a las expresiones para la inhibición competitiva y acompetitiva cuando, respectivamente, $\alpha' = 1{,}0$ o $\alpha = 1{,}0$. A partir de esta expresión podemos resumir los efectos de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos individuales. Para todos los inhibidores reversibles se cumple que la V_{max} aparente es igual V_{max}/α', porque el lado derecho de la ecuación 6-30 siempre se simplifica a V_{max}/α' a concentraciones de sustrato suficientemente grandes. En el caso de los inhibidores competitivos, $\alpha' = 1{,}0$ y podemos, por tanto, ignorar este parámetro. A partir de esta expresión para la V_{max} aparente podemos deducir una expresión para la K_m aparente y demostrar el cambio que se produce en este parámetro en presencia de inhibidores reversibles. La K_m aparente es, como siempre, igual a la [S] a la que la V_0 es la mitad de la V_{max} aparente o, de modo más general, aquella a la que $V_0 = V_{max}/2\alpha'$. Se llega a esta situación cuando $[S] = \alpha K_m/\alpha'$. De este modo, la K_m aparente es igual a $\alpha K_m/\alpha'$. Los términos α y α' reflejan la unión del inhibdor a E y ES, respectivamente. Así, el término $\alpha K_m/\alpha'$ es una expresión matemática de la afinidad relativa del inhibidor hacia las dos formas enzimáticas. Esta expresión es más sencilla cuando α o α' son igual a 1,0 (para inhibidores acompetitivos o competitivos), tal como se resume en la Tabla 6-9.

En la práctica, las inhibiciones mixta y acompetitiva sólo se observan en enzimas con dos o más sustratos (p. ej. S_1 y S_2) y son muy importantes en el análisis experimental de estos enzimas. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_1, puede actuar como un inhibidor competitivo en los experimentos en los que varía la $[S_1]$. Si un inhibidor se fija en un sitio normalmente ocupado por S_2, puede actuar como un inhibidor mixto o acompetitivo de S_1. Los patrones reales de inhibición observados dependen de si los acontecimientos de fijación de S_1 y S_2 son ordenados o se producen al azar, y por consiguiente se puede determinar el orden en que los sustratos se fijan y los productos se liberan del sitio activo. A menudo el uso de uno de los productos de reacción como inhibidor puede ser especialmente informativo. Si sólo está presente uno de los dos productos de reacción, no se puede dar la reacción inversa. Sin embargo, un producto se fijará generalmente en alguna parte del sitio activo para así funcionar como un inhibidor cuando no está presente el segundo producto. Los enzimólogos llevan a cabo elaborados estudios cinéticos en el estado estacionario con diversas combinaciones y cantidades de productos e inhibidores junto con análisis del estado pre-estacionario con el fin de obtener una imagen detallada del mecanismo de las reacciones bisustrato.

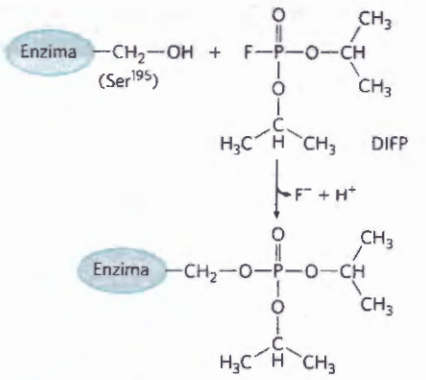


FIGURA 6-18 Inhibición irreversible. La reacción de la quimotripsina con el diisopropilfluorofosfato (DIFP), que modifica la Ser^{195} inhibe el enzima irreversiblemente. Esta reacción condujo al descubrimiento de que la Ser^{195} es el residuo clave del sitio activo de la quimotripsina.

EJEMPLO PRÁCTICO 6-3 Efecto de un inhibidor sobre la K_m

El grupo de investigación que trabaja con la felicidasa (véanse los Ejemplos Prácticos 6-1 y 6-2) descubren que el compuesto STRESS es un potente inhibidor competitivo de la felicidasa. La adición de STRESS 1 nM aumenta la K_m observada para TRISTE en un factor de 2. ¿Cuáles son los valores de α y α' en estas condiciones?

Solución: Recuerde que la K_m aparente, la K_m medida en presencia de un inhibidor competitivo, se define como αK_m. Puesto que la K_m para TRISTE aumenta en un factor de 2 en presencia de STRESS 1nM, el valor de α debe ser 2. El valor de α' es 1 por definición para una inhibición competitiva.

Inhibición irreversible Los **inhibidores irreversibles** se unen de manera covalente o destruyen un grupo funcional del enzima que es esencial para su actividad, o forman una asociación no covalente muy estable. Es frecuente la formación de un enlace covalente entre un inhibidor irreversible y un enzima. Los inhibidores irreversibles son también muy útiles para estudiar los mecanismos de reacción. Los aminoácidos con funciones catalíticas clave en el sitio activo pueden ser identificados, en ocasiones, determinando qué aminoácido se ha unido covalentemente a un inhibidor después de la inactivación del enzima. En la **Figura 6-18** se muestra un ejemplo.

Un caso muy especial de inhibidores irreversibles son los **inactivadores suicidas**. Estos compuestos son relativamente poco reactivos hasta que se unen al sitio activo de un enzima específico. Un inactivador suicida pasa a través de los primeros pasos de la reacción enzimática normal, pero a continuación se convierte en un compuesto muy reactivo que se combina irreversiblemente con el enzima en lugar de ser transformado en el producto normal. A estos compuestos también se les llama **inactivadores basados en el mecanismo** ya que utilizan el mecanismo de reacción enzimático normal para inactivar el enzima. Los inactivadores suicidas juegan un papel central en el *diseño racional de fár-*

RECUADRO 6-3 MEDICINA Un caballo de Troya bioquímico para la curación de la enfermedad del sueño africana

La cubierta celular de los tripanosomas está revestida de una sola proteína que es el antígeno al que responde el sistema inmunitario. Sin embargo, de vez en cuando, por un proceso de recombinación génica (véase la Tabla 28-1), unas cuantas células de la población infecciosa de tripanosomas la modifican a una nueva proteína de la cubierta, de forma que deja de ser reconocida por el sistema inmunológico. Este proceso de "cambio de la cubierta" puede tener lugar centenares de veces. El resultado es una infección crónica cíclica: el paciente tiene fiebre, que remite cuando el sistema inmunológico vence la primera infección; los tripanosomas que han modificado su envoltura actúan de germen para una segunda infección, de manera que la fiebre vuelve a aparecer. Este ciclo puede repetirse durante semanas, hasta que el paciente, extremamente debilitado, muere.

Algunos procedimientos modernos para tratar la enfermedad del sueño africana se basan en los conocimientos de enzimología y metabolismo. En, al menos uno de estos enfoques, se utilizan compuestos farmacológicos diseñados para actuar como inactivadores del mecanismo enzimático (inactivadores suicidas). Un punto vulnerable en el metabolismo de los tripanosomas es la ruta de biosíntesis de poliaminas. Las poliaminas, espermina y espermidina, implicadas en el empaquetamiento del DNA, se necesitan en grandes cantidades en las células en rápida división. El primer paso de su síntesis está catalizado por la ornitina descarboxilasa, un enzima que precisa el coenzima piridoxal fosfato para su función. El piridoxal fosfato (PLP) que proviene de la vitamina B_6 forma un enlace covalente con los aminoácidos sustrato de las reacciones en las que interviene actuando como sumidero electrónico que facilita diversas reacciones diferentes (véase la Fig. 22-32) En las células de los mamíferos, la ornitina descarboxilasa tiene un recambio rápido, es decir, se degrada y se sintetiza rápida y continuamente. Sin embargo, por razones no

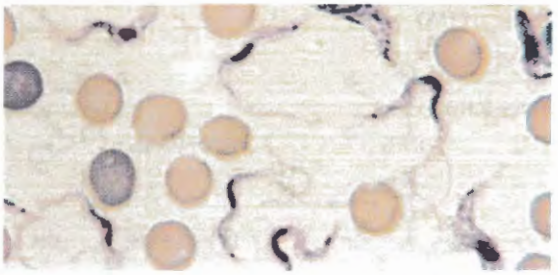


FIGURA 1 *Trypanosoma brucei rhodesiense*, uno de los agentes causales de la enfermedad del sueño africana. [Fuente: John Mansfield-University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.]

comprendidas del todo, el enzima de algunos tripanosomas es estable y no es rápidamente reemplazado por enzima de nueva síntesis. Un inhibidor de la ornitina descarboxilasa que se uniera de forma permanente al enzima tendría pues poco efecto sobre las células de los mamíferos, que podrían reemplazar rápidamente el enzima inactivado, pero afectaría adversamente al parásito.

Los primeros pasos de la reacción normal catalizada por la ornitina descarboxilasa se muestran en la Figura 2. Una vez liberado el CO_2, el desplazamiento de los electrones se invierte y se forma putrescina (véase la Fig. 22-32). Se han diseñado diferentes inhibidores suicidas para este enzima basados en este mecanismo, entre ellos la difluorometilornitina (DFMO). La DFMO es relativamente inerte en solución. Sin embargo, cuando se une a la ornitina descarboxilasa el enzima se inactiva rápidamente (Fig. 3). Este inhibidor constituye un sumidero de electrones alternativo debido a sus dos átomos de flúor colocados estratégicamente, que son excelentes grupos salientes. En lugar de que los electrones entren en la estructura anular del PLP, la reacción provoca el desplazamiento de un átomo de flúor. El -S de un residuo Cys en el sitio activo del enzima forma entonces un

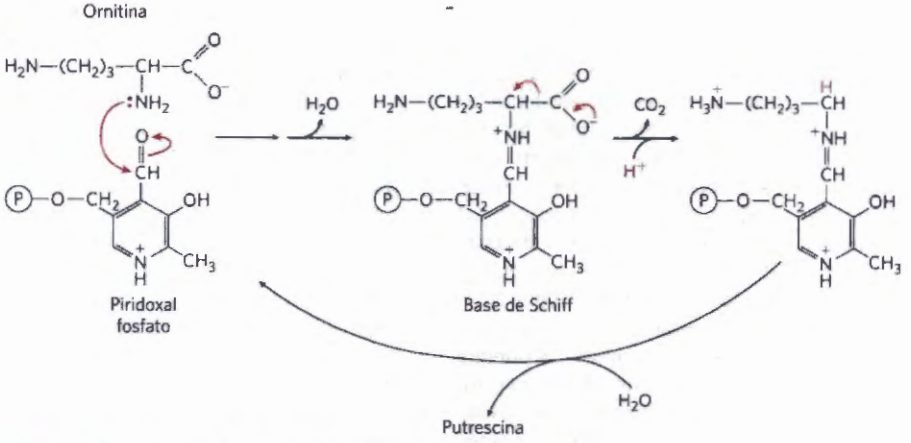


FIGURA 2 Mecanismo de reacción de la ornitina descarboxilasa.

RECUADRO 6-3 MEDICINA Un caballo de Troya bioquímico para la curación de la enfermedad del sueño africana *(continuación)*

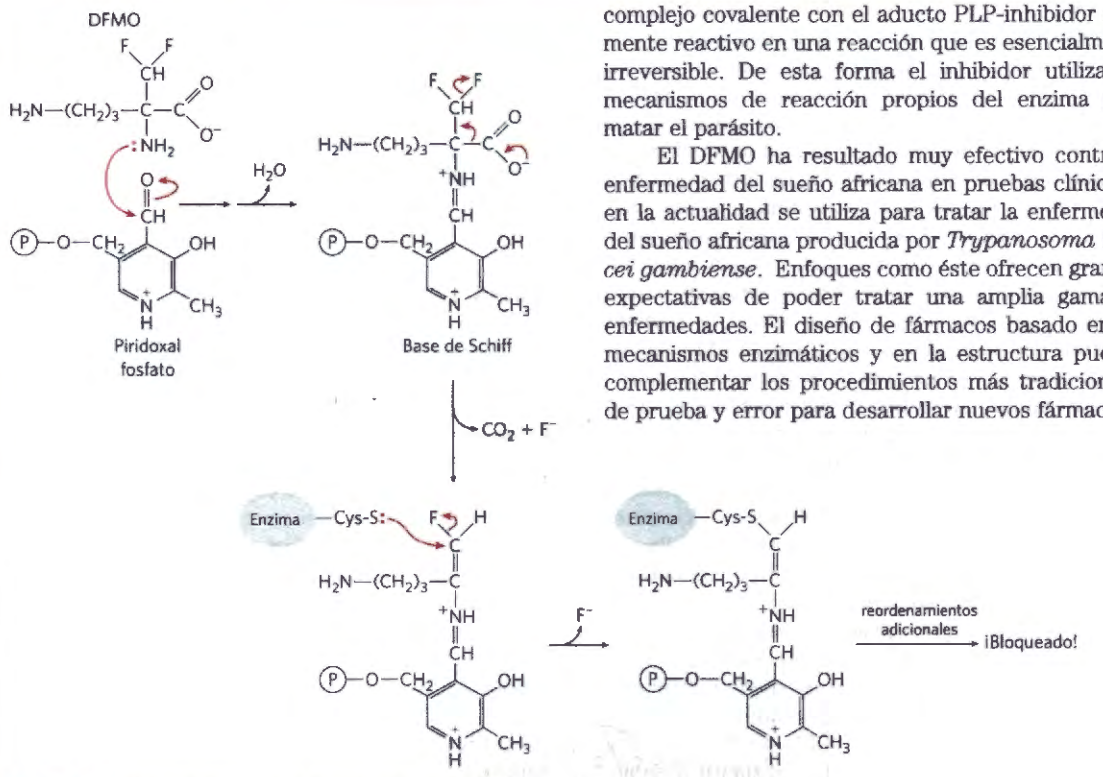


FIGURA 3 Inhibición de la ornitina descarboxilasa por DFMO.

complejo covalente con el aducto PLP-inhibidor altamente reactivo en una reacción que es esencialmente irreversible. De esta forma el inhibidor utiliza los mecanismos de reacción propios del enzima para matar el parásito.

El DFMO ha resultado muy efectivo contra la enfermedad del sueño africana en pruebas clínicas y en la actualidad se utiliza para tratar la enfermedad del sueño africana producida por *Trypanosoma brucei gambiense*. Enfoques como éste ofrecen grandes expectativas de poder tratar una amplia gama de enfermedades. El diseño de fármacos basado en los mecanismos enzimáticos y en la estructura pueden complementar los procedimientos más tradicionales de prueba y error para desarrollar nuevos fármacos.

macos, un método moderno para la obtención de nuevos agentes farmacéuticos mediante el que se sintetizan nuevos sustratos en base al conocimiento adquirido sobre sustratos y mecanismos de reacción. Un inactivador suicida bien diseñado es específico para un único enzima y no reacciona hasta que se halla en el sitio activo del mismo, por lo que los fármacos basados en este método suelen presentar la importante ventaja de tener pocos efectos secundarios (véase el Recuadro 6-3). Al final de la Sección 6.4 se describen algunos ejemplos de inhibidores irreversibles de importancia médica.

Un inhibidor irreversible no necesita estar unido covalentemente al enzima. La unión no covalente es suficiente si tal unión es tan fuerte que el inhibidor sólo se disocia en raras ocasiones. ¿Cómo se sintetiza un inhibidor de unión fuerte? Recuerde que los enzimas han evolucionado para fijarse muy fuertemente a los estados de transición de las reacciones que catalizan. En principio, si uno puede diseñar una molécula que se parezca al estado de transición ésta debería unirse fuertemente al enzima. Aunque los estados de transición no se pueden observar directamente, los químicos pueden predecir a menudo la estructura aproximada de un estado de transición en base al conocimiento acumulado sobre los mecanismos de reacción. El estado de transición es, por definición, efímero y tan inestable que la medida directa de la interacción de unión entre esta especie y el enzima es imposible. No obstante, en algunos casos se pueden diseñar moléculas estables que se parezcan a los estados de transición. Se las denomina **análogos del estado de transición**. Se unen más fuertemente al enzima que el sustrato en el complejo ES, ya que encajan mejor en el sitio activo (es decir, forman un mayor número de interacciones débiles) que el propio sustrato. La idea de los análoogos del estado de transición fue sugerida por Pauling en la década de 1940 y se ha explorado utilizando diversos enzimas. Por ejemplo, los análogos del estado de transición diseñados para inhibir el enzima glucolítico aldolasa se unen al enzima más de cuatro órdenes de magnitud más fuertemente que los sustratos **(Fig. 6-19)**. Estos experimentos presentan la limitación de que un análgo del estado de transición no puede imitar perfectamente al estado de transición. Algunos análogos, sin embargo, se unen al enzima diana entre 10^2 y 10^8 veces más fuertemente que el sustrato normal, lo que proporciona buenas pruebas de que, ciertamente, los sitios activos de los enzimas son complementarios del estado de transición. El concepto de análogos del estado de transición es importante para el diseño de nuevos agentes terapéuticos. Tal como veremos, los potentes medicamentos anti-VIH denominados inhibidores de la proteasa se diseñaron en parte como análogos del estado de transición de unión fuerte.

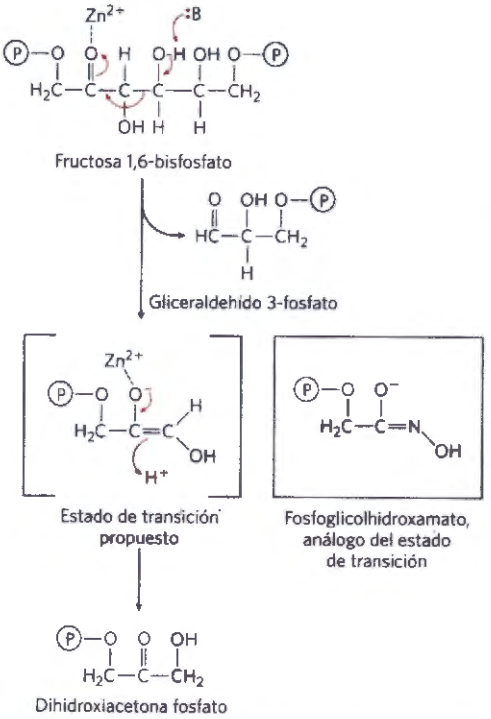


FIGURA 6-19 Análogo del estado de transición. En la glucólisis, una aldolasa de clase II (que se encuentra en hongos y bacterias) cataliza la rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato formando gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (véase la Fig. 14-6 para un ejemplo de aldolasa de clase I, presente en animales y plantas superiores). La reacción transcurre vía un mecanismo del tipo de condensación aldólica inversa. El compuesto fosfoglicolhidroxamato se parece al estado de transición propuesto, enediolato, fijándose al enzima casi 10.000 veces mejor que el producto dihidroxiacetona fosfato.

RESUMEN 6.3 La cinética enzimática como método para comprender el mecanismo

■ Muchos enzimas comparten algunas propiedades cinéticas. Cuando se añade sustrato a un enzima, la reacción llega rápidamente a un estado estacionario en el que la velocidad a la que se forma el complejo ES se equilibra con la velocidad a la que se descompone. Al aumentar [S] aumenta la actividad de un enzima a concentración fija en el estado estacionario; este aumento se produce siguiendo una curva hiperbólica que tiende a su máximo valor de velocidad, V_{max}, en el cual prácticamente todo el enzima ha formado complejo con su sustrato.

■ La concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de V_{max} es la constante de Michaelis, K_m, que es característica para cada enzima que actúa sobre un sustrato determinado. La ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

relaciona la velocidad inicial con [S] y V_{max} a través de la constante K_m. La cinética de Michaelis-Menten se denomina también cinética del estado estacionario.

■ K_m y V_{max} tienen significados diferentes para diferentes enzimas. La velocidad limitante de una reacción catalizada por un enzima en condiciones de saturación se describe mediante la constante k_{cat}, o número de recambio. La relación k_{cat}/K_m proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica. La ecuación de Michaelis-Menten también es aplicable a reacciones bisustrato, que tienen lugar a través de la formación de complejos ternarios o mediante mecanismos Ping-Pong. Todos los enzimas tienen un pH óptimo (o un margen de pH óptimo) en el que presentan la máxima actividad. (de doble desplazamiento).

■ La cinética del estado pre-estacionario puede proprcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de reacción enzimáticos.

■ La inhibición reversible de un enzima puede ser competitiva, acompetitiva o mixta. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por su unión reversible al sitio activo, pero no son transformados por el enzima. Los inhibidores acompetitivos sólo se unen al complejo ES en un sitio distinto del sitio activo. Los inhibidores mixtos se unen a E o a ES, también en un sitio distinto del sitio activo. En la inhibición irreversible, un inhibidor se une permanentemente a un sitio activo, ya sea formando un enlace covalente o una interacción no covalente muy estable.

6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

Este capítulo se ha centrado hasta ahora en los principios generales de la catálisis y en una introducción a algunos de los parámetros cinéticos utilizados para describir la acción enzimática. Pasamos ahora a estudiar algunos ejemplos específicos de mecanismos de reacción enzimáticos.

La comprensión del mecanismo de acción completo de un enzima purificado requiere la identificación de todos los sustratos, cofactores, productos y reguladores. Además requiere un conocimiento de (1) la secuencia temporal en la que se producen los intermedios de reacción unidos al enzima, (2) la estructura de cada intermedio y de cada estado de transición, (3) las velocidades de interconversión entre los intermedios, (4) la relación estructural del enzima con cada intermedio y (5) las contribuciones energéticas de todos los grupos reactivos e interaccionantes con respecto a los complejos intermedios y a los estados de transición. Aún hay pocos enzimas de los que tengamos un conocimiento que cumpla todos estos requisitos.

A continuación se presentan los mecanismos de cuatro enzimas: quimotripsina, hexoquinasa, enolasa y lisozima. Con ellos no se pretende cubrir todo el espectro de la química enzimática. Su elección se debe en parte a que se cuentan entre los enzimas mejor conocidos y en parte a que ilustran claramente algunos principios generales esbozados en este capítulo. La discusión se concentra en principios seleccionados junto con algunos experimentos clave que han ayudado a su demostración. El ejemplo de la quimotripsina se utiliza para revisar algunas de las convenciones utilizadas para describir mecanismos enzimáticos. No se incluye gran parte de los detalles mecanísticos y de las pruebas experimentales; ningún libro podría documentar completamente la rica historia experimental de estos enzimas. Tampoco se entra a discutir la contribución espe-

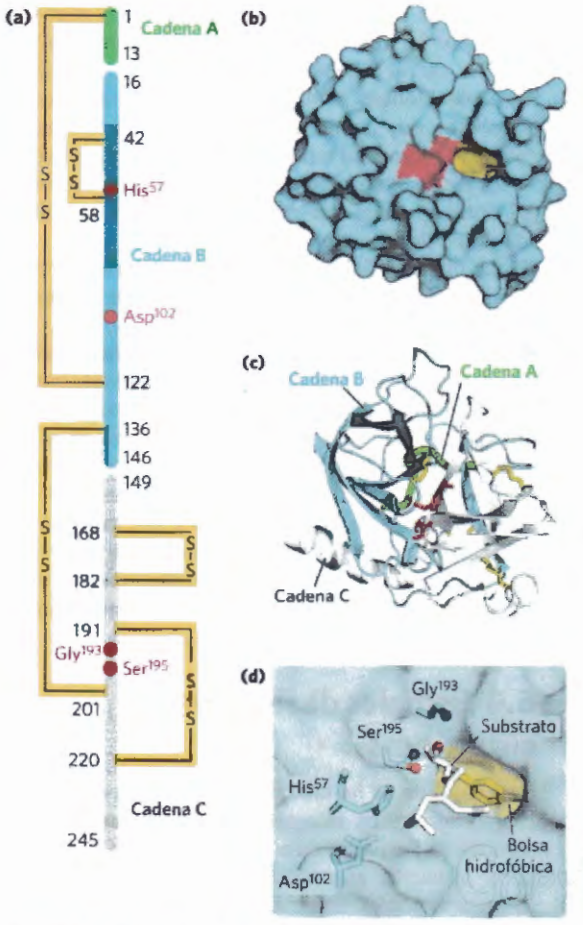


FIGURA 6-20 Estructura de la quimotripsina. **(a)** Representación de la estructura primaria en la que se muestran los enlaces disulfuro y los residuos aminoácidos clave en la catálisis. La proteína consta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas mediante enlaces disulfuro. (La numeración de los residuos de la quimotripsina, con los residuos 14, 15, 147 y 148 "ausentes" se explica en la Figura 6-38). Los residuos aminoácidos del sitio activo se encuentran agupados en la estructura tridimensional. **(b)** Una representación del enzima en la que se resalta su superficie. La bolsa hidrofóbica en la que se une la cadena lateral aromática del aminoácido del sustrato se muestra en amarillo. Los residuos clave del sitio activo, entre ellos Ser^{195}, His^{57} y Asp^{102} se muestran en rojo. El papel que juegan estos residuos en la catálisis se explica en la Fig. 6-22. **(c)** Esqueleto polipeptídico de la quimotripsina en representación de cintas; los puentes disulfuro se muestran en amarillo; las tres cadenas tienen el mismo color que en **(a)**. **(d)** Ampliación del sitio activo con un sustrato (blanco y amarillo) unido. El grupo hidroxilo de la Ser^{195} ataca el grupo carbonilo del sustrato (los oxígenos están en rojo); la carga negativa que se forma sobre el oxígeno es estabilizada por el hueco del oxianión (los nitrógenos amídicos, incluido uno de la Ser^{195}, en azul), tal como se explica en la Fig. 6-22. En el sustrato, la cadena lateral del aminoácido aromático (en amarillo) se encuentra en la bolsa hidrofóbica. El nitrógeno amídico del enlace peptídico que se ha de romper (que se proyecta hacia el observador e indica el camino del resto de la cadena polipeptídica del sustrato) se muestran en blanco. [Fuente: (b, c, d) PDB ID 7GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29, 7600, 1990.]

cial de los coenzimas en la actividad catalítica de muchos enzimas. La química coenzimática es muy variada y describiremos cada uno de los casos al tiempo que nos vamos encontrando con ellos en la Parte II.

El mecanismo de la quimotripsina implica acilación y desacilación de un residuo Ser

La quimotripsina pancreática bovina (M_r 25.191) es una proteasa, un enzima que cataliza la rotura hidrolítica de enlaces peptídicos. Esta proteasa actúa específicamente sobre los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr). En la **Figura 6-20** se muestra la estructura tridimensional de la quimotripsina, realzándose los grupos funcionales del sitio activo. La reacción catalizada por este enzima ilustra el principio de la estabilización del estado de transición a la par que proporciona un ejemplo clásico de la utilización de la catálisis ácido-base general y de la catálisis covalente.

La quimotripsina aumenta la velocidad de hidrólisis del enlace peptídico en un factor de al menos 10^9. El enzima no cataliza el ataque directo del agua sobre el enlace peptídico sino que, en su lugar, se forma un intermedio acil-enzima covalente transitorio. Así, la reacción tiene dos fases distintas. En la fase de acilación se rompe el enlace peptídico y se forma un enlace éster entre el carbono carbonílico del péptido y el enzima. En la fase de desacilación se hidroliza el enlace éster, regenerándose el enzima no acilado.

La primera prueba de la formación de un intermedio acil-enzima covalente se dedujo a partir de una aplicación clásica de la cinética en el estado pre-estacionario. Además de su actuación sobre polipéptidos, la

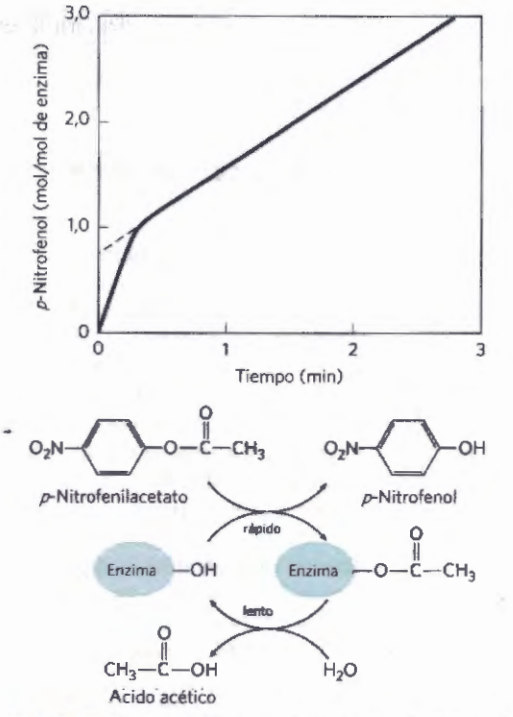


FIGURA 6-21 Pruebas cinéticas en el estado preestacionario de la existencia de un intermedio acil-enzima. La hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina se mide por la liberación del *p*-nitrofenol (un producto coloreado). Inicialmente, se observa una liberación rápida (*burst*) de una cantidad de *p*-nitrofenol que es casi estequiométrica con la cantidad de enzima presente. Esto es consecuencia de la fase rápida de acilación de la reacción. La velocidad posterior es menor porque el recambio del enzima viene limitado por la velocidad de la fase más lenta de desacilación.

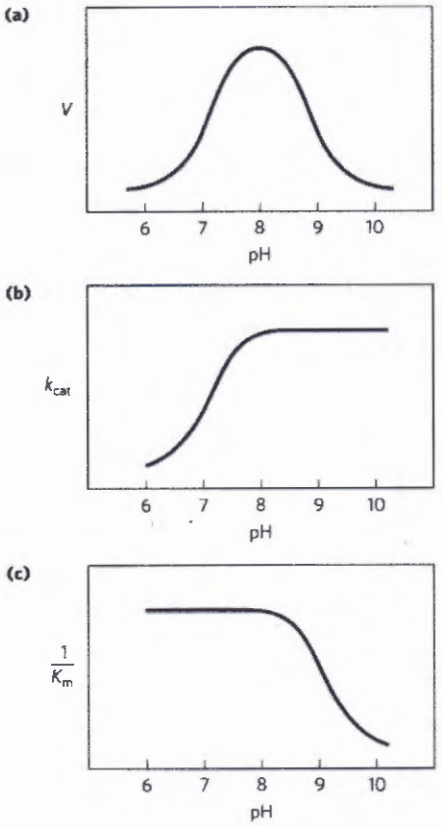


FIGURA 6-22 Dependencia del pH de la reacción catalizada por la quimotripsina. **(a)** La velocidad de la reacción catalizada por la quimotripsina representada frente al pH genera una curva en forma de campana con un pH óptimo a 8,0. La velocidad (v) que se representa se ha obtenido a bajas concentraciones de sustrato y refleja, por tanto, el término k_{cat}/K_m. La gráfica se puede descomponer usando métodos cinéticos para determinar separadamente los términos k_{cat} y K_m a cada pH. Cuando se hace esta descomposición, (**b** y **c**), queda claro que la transición que se produce justo por encima de pH 7 es debida a cambios en k_{cat}, mientras que la que se produce por encima de pH 8,5 es debida a cambios en $1/K_m$. Estudios cinéticos y estructurales han demostrado que las transiciones ilustradas en (b) y (c) reflejan los estados de ionización de la cadena lateral de la His^{57} (cuando no hay sustrato unido) y del grupo α-amino de la Ile^{16} (en el extremo amino de la cadena B), respectivamente. His^{57} debe estar desprotonada e Ile^{16} debe estar protonada para alcanzar la actividad óptima.

quimotripsina también cataliza la hidrólisis de pequeños compuestos éster y amida. Estas reacciones son mucho más lentas que la hidrólisis de péptidos debido a que la energía de fijación disponible es menor con estos sustratos pequeños, por lo que son mucho más fáciles de estudiar. Los experimentos de B. S. Hartley y B. A. Kilby en 1954 mostraron que la hidrólisis del éster *p*-nitrofenilacetato por la quimotripsina, medida a partir la liberación de *p*-nitrofenol tenía lugar a través de una rápida explosión inicial (burst) antes de estabilizarse a una velocidad menor **(Fig. 6-21)**. Por extrapolación a tiempo cero, concluyeron que la fase de "burst" correspondía prácticamente a una molécula de *p*-nitrofenol liberada por cada molécula de enzima presente. Hartley y Kilby sugirieron que ello representaba una acilación rápida de todas las moléculas de enzima (con liberación de *p*-nitrofenol) y que la velocidad del posterior retorno del enzima a su estado libre estaba limitada por un paso de desacilación lento. Desde entonces se han obtenido resultados parecidos con muchos enzimas. Esta observación de la fase de "burst" proporciona otro ejemplo del uso de la cinética en el desglose de una reacción en sus etapas constituyentes.

Se han deducido otras características del mecanismo de la quimotripsina mediante el análisis de la dependencia de la reacción con el pH. La velocidad de la hidrólisis catalizada por la quimotripsina representada frente al pH suele presentar forma de campana **(Fig. 6-22)**. Las velocidades representadas en la Figura 6-22a se obtuvieron a concentraciones de sustrato bajas (por debajo de saturación) y son indicativas por tanto del valor de k_{cat}/K_m (vea la Ecn. 6-27, p. 203). Un análisis más completo de la velocidad a diferentes concentraciones de sustrato a cada pH permite permite determinar las contribuciones individuales de los términos k_{cat} y K_m. Una vez obtenidas las velocidades máximas a cada pH se pueden representar los valores de k_{cat} sola con respecto al pH (Fig. 6-22b); después de obtener la K_m a cada pH es posible representar los valores de $1/K_m$ (Fig. 6-22c). Estudios cinéticos y estructuraless han demostrado que los cambios en k_{cat} reflejan el estado de ionización de la His^{57}. El descenso de k_{cat} a pH bajo es el resultado de la protonación de la His^{57} (que no puede en esta situación extraer un protón de la Ser^{195} en el paso ❷ de la reacción; véase la **Fig. 6-23**). Esta reducción en la velocidad ilustra la importancia de la catálisis ácido-base general en el mecanismo de la quimotripsina. Los cambios en el término $1/K_m$ reflejan la ionización del grupo α-amino de Ile^{16} (en el extremo amino terminal de una de las tres cadenas polipeptídicas de la quimotripsina). Este grupo forma un puente salino con el Asp^{194}, que estabiliza la conformación activa del enzima. Cuando este grupo pierde su protón a pH elevado, desaparece el puente salino y se produce un cambio de conformación que cierra la bolsa hidrofóbica donde se inserta la cadena lateral aromática del sustrato (Fig. 6-20). En esta situación los sustratos ya no pueden unirse adecuadamente, lo que se refleja cinéticamente en forma de un aumento en la K_m.

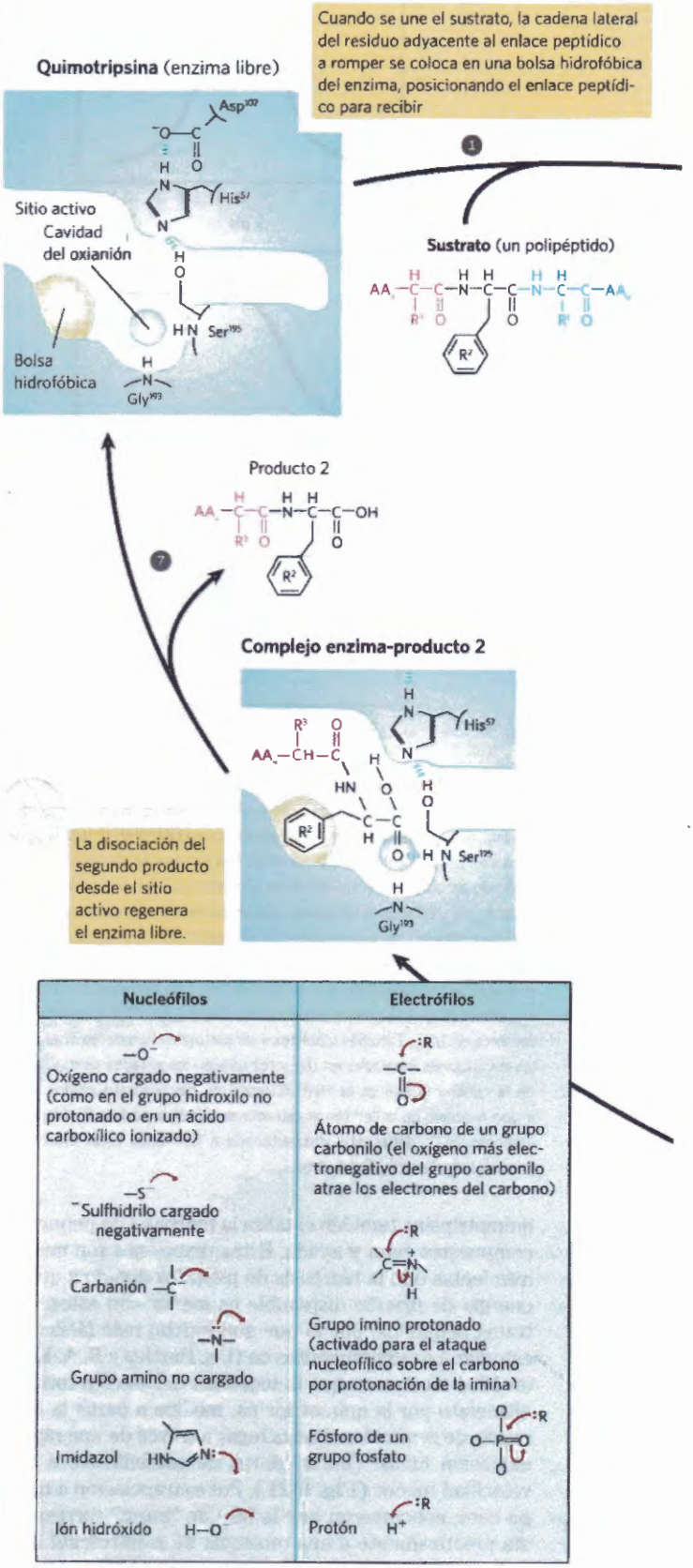
Tal como se observa en la Figura 6-23, el nucleófilo que interviene en la fase de acilación es el oxígeno de la Ser195. (Las proteasas con un residuo Ser implicado en el mecanismo catalítico se denominan **serina-proteasas**.) El pK_a del grupo hidroxilo de una Ser es generalmente demasiado elevado para que la forma no protonada se halle presente en concentraciones significativas a pH fisiológico. Sin embargo, en la quimotripsina, la Ser^{195} está unida a la His^{57} y al Asp^{102} a través de una red de enlaces de hidrógeno que se conoce como **tríada catalítica**. Cuando un sustrato peptídico se une a la quimotripsina se produce un ligero cambio de la conformación que comprime el enlace de hidrógeno entre His^{57} y Asp^{102}, lo que genera una interacción más fuerte, denominada enlace de hidrógeno de baja barrera energética. Esta interacción estabilizada aumenta el pK_a de la His^{57} desde un valor de ~7 (para la histidina libre) a más de 12, lo que permite que el residuo de His actúe como una base general más fuerte que puede extraer el protón del grupo hidroxilo de la Ser^{195}. La desprotonación impide el desarrollo de una carga positiva muy inestable sobre el hidroxilo de la Ser^{195} al tiempo que hace que la cadena lateral de la Ser se convierta en un

Cómo leer mecanismos de reacción. Un repaso.

Los mecanismos de reacción química, que describen la formación y rotura de enlaces covalentes, se representan con puntos y con flechas curvadas, una convención conocida informalmente como "empuje electrónico". Un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido. Los electrones no enlazados que son importantes para el mecanismo de reacción se designan con puntos (⁻ÖH). Las flechas curvadas (↷)representan el movimiento de pares de electrones. Las flechas de cabeza simple (en forma de anzuelo) se usan para el movimiento de un solo electrón (↶) (como en las reacciones de radicales libres). La mayoría de pasos de una reacción involucran un par de electrones no compartido (como en el caso del mecanismo de la quimotripsina).

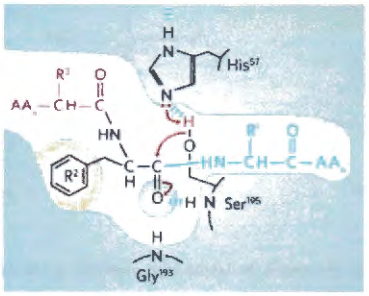
Algunos átomos son más electronegativos que otros, es decir, atraen más fuertemente los electrones. Las electronegatividades relativas de los átomos que se discuten en este texto son F > O > N > C ≈ S > P ≈ H. Por ejemplo, los dos pares de electrones que forman un enlace C=O (carbonilo) no se encuentran repartidos uniformemente; el carbono es relativamente electrodeficiente, mientras que el oxígeno atrae más a los electrones. Muchas reacciones implican la actuación de un átomo rico en electrones (un nucleófilo) que reacciona con un átomo deficiente en electrones (un electrófilo). A la derecha se muestran algunos nucleófilos y electrófilos comunes en bioquímica.

En general, un mecanismo de reacción se inicia en un par electrónico no compartido de un nucleófilo. En los diagramas de mecanismos, la base de la flecha de empuje electrónico está situada cerca de los puntos del par de electrones, y la cabeza apunta directamente al centro electrofílico que está siendo atacado. Allí donde un par de electrones no compartido confiera una carga negativa formal al nucleófilo, el mismo signo negativo puede representar al par de electrones no compartido y servir de base de la flecha. En el mecanismo de la quimotripsina, el par de electrones nucleofílico del complejo ES entre los pasos ❶ y ❷ es aportado por el oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser[195]. Este par de electrones (2 de los 8 electrones de valencia del oxígeno hidroxílico) constituye la base de la flecha curvada. El centro electrofílico que está siendo atacado es el carbono carbonílico del enlace peptídico a romper. Los átomos de C, O y N tienen un máximo de 8 electrones de valencia, mientras que el H tiene un máximo de 2. Estos átomos se encuentran ocasionalmente en estados inestables con una dotación electrónica inferior al máximo posible, pero C, O y N no pueden tener nunca más de 8 electrones. De este modo, cuando el par de electrones de la Ser[195] de la quimotripsina ataca al carbono carbonílico del sustrato, se produce el desplazamiento de un par de electrones de la capa de valencia del carbono (¡no es posible tener cinco enlaces en un carbono!). Estos electrones se desplazan hacia el oxígeno carbonílico más electronegativo. El oxígeno tiene 8 electrones de valencia tanto antes como después de este proceso químico, pero el número de los compartidos se reduce de 4 a 2, con lo que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa. En el paso siguiente, el par de electrones que le confiere la carga negativa al oxígeno vuelve atrás para reformar el enlace con el carbono, restableciendo el enlace carbonilo. También en este caso se debe desplazar un par de electrones del carbono, concretamente el compartido con el grupo amino del enlace peptídico. Este último paso rompe el enlace peptídico. Los pasos siguientes siguen procesos similares.



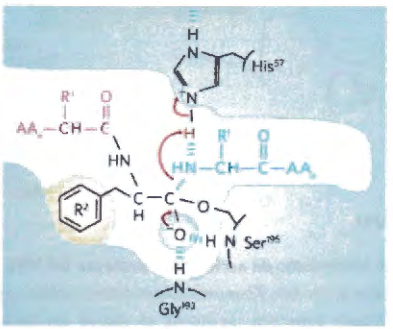
Complejo Enzima-sustrato

La interacción de la Ser^{195} y la His^{57} genera un ión alcóxido fuertemente nucleofílico en la Ser^{195}; el ión ataca el grupo carbonilo del enlace peptídico, formando un intermediario tetraédrico acil-enzima. Esto va acompañado de la formación de una carga negativa de vida corta sobre el oxígeno carbonílico del sustrato, que es estabilizada por enlace de hidrógeno en la cavidad del oxianión.

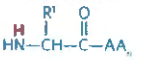


Intermediario de vida corta* (acilación)

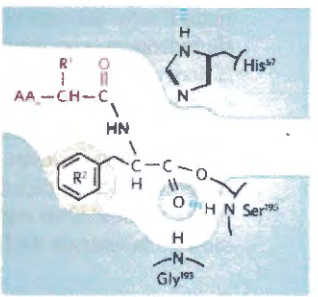
La inestabilidad de la carga negativa sobre el oxígeno carbonílico del sustrato conduce al colapso del intermediario tetraédrico; la re-formación de un enlace doble con el carbono desplaza el enlace entre el carbono y el grupo amino de la unión peptídica, rompiéndolo. El grupo amino saliente es protonado por la His^{57}, lo que facilita su desplazamiento.



Producto 1

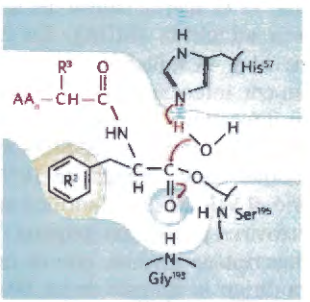


Intermediario acil-enzima



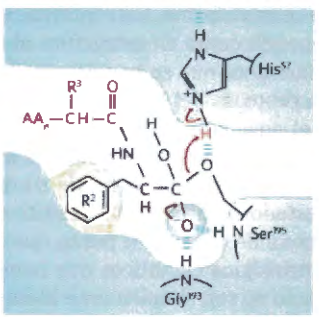


Intermediario acil-enzima



Una molécula de agua entrante se desprotona por catálisis básica general, generando un ión hidróxido fuertemente nucleofílico. El ataque del ión hidróxido sobre la unión éster del acil-enzima genera un segundo intermediario tetraédrico, mientras el oxígeno en la cavidad del oxianión vuelve a tomar carga negativa.

Intermediario de vida corta* (desacilación)



El colapso del intermediario tetraédrico forma el segundo producto, un anión carboxilato, y desplaza la Ser^{195}.

FIGURA DE MECANISMO 6-23 Rotura hidrolítica de un enlace peptídico por la quimotripsina. La reacción tiene dos fases. En la fase de acilación (pasos ❶ a ❹), la formación de un intermedio acil-enzima covalente está acoplada a la rotura de un enlace peptídico. En la fase de desacilación (pasos ❺ a ❼), se regenera el enzima libre, ésta es esencialmente la vía inversa a la fase de acilación, en la que el agua hace la misma función, en sentido inverso, que el componente amino del sustrato.

*Al intermedio tetraédrico de vida corta formado después del paso ❷, así como al segundo intermedio tetraédrico que se forma más adelante, se les denomina a veces, estados de transición, pero esta terminología puede dar lugar a confusión. Un *intermedio* es cualquier especie química con un tiempo de vida finito, entendiéndose por "finito" un tiempo superior a una vibración molecular (~10^{-13} segundos). Un *estado de transición* es, simplemente, la especie de máxima energía que se forma en la coordenada de reacción y no tiene un tiempo de vida finito. Los intermedios tetraédricos que se forman en la reacción de la quimotripsina se parecen mucho, tanto energética como estructuralmente, a los estados de transición que llevan a su formación y degradación. No obstante, el intermedio representa un paso comprometido en la formación completa de un enlace, mientras que el estado de transición es parte del proceso de reacción. En el caso de la quimotripsina, dada la estrecha relación entre el intermedio y el estado de transición real se pasa por alto de manera rutinaria esta distinción. Además, la interacción del oxígeno cargado negativamente con los nitrógenos amídicos en el hueco del oxianión, a menudo conocida como estabilización del estado de transición, también sirve en este caso para estabilizar el intermedio. No todos los intermedios tienen una vida corta de modo que se parezcan a los estados de transición. El intermedio acil-enzima de la quimotripsina es mucho más estable y se detecta y estudia mucho más fácilmente por lo que nunca se confunde con el estado de transición.

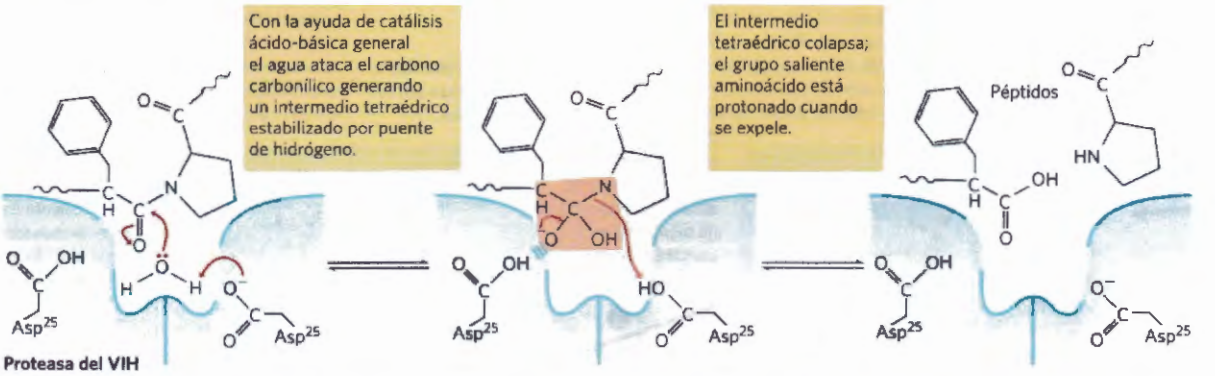


FIGURA 6-24 Mecanismo de acción de la proteasa del VIH. Dos residuos Asp del sitio activo (en diferentes subunidades) actúan como catalizadores ácido-base generales facilitando el ataque del agua sobre el enlace peptídico. El intermedio tetraédrico inestable en la ruta de reacción está sombreado rojo claro.

nucleófilo más fuerte. En fases posteriores de la reacción, la His^{57} también actúa como dador de protones, protonando el grupo amino libre de la parte desplazada del sustrato (el grupo saliente).

Cuando el oxígeno de la Ser^{196} ataca el grupo carbonilo del sustrato, se forma un intermedio tetraédrico de vida muy corta en el que el oxígeno carbonílico adquiere una carga negativa (Fig. 6-23, paso ❷). Esta carga, formada en el interior de una bolsa del enzima denominada hueco del oxianión, se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno con los grupos amida de dos enlaces peptídicos del esqueleto de la quimotripsina. Uno de estos enlaces de hidrógeno (el proporcionado por la Gly^{193}) está presente solamente en este intermedio y en los estados de transición que conducen a su formación y descomposición, reduciendo la energía necesaria para llegar a ellos. Esto constituye un ejemplo de la utilización de la energía de fijación en la catálisis.

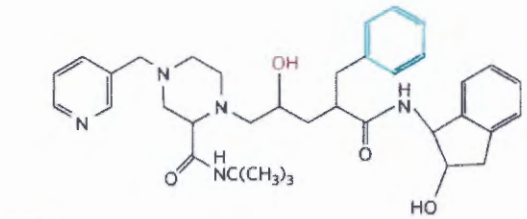
El conocimiento del mecanismo de las proteasas conduce a nuevos tratamientos para las infecciones con VIH

Los nuevos agentes terapéuticos se diseñan casi siempre para inhibir un enzima. Un ejemplo de ello lo constituyen las muy eficientes terapias para tratar las infecciones por VIH. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En 2015 se calculaba que entre 34 y 41 millones de personas en todo el mundo vivían con infecciones por VIH, con unos 2 millones de nuevas infecciones cada año y y aproximadamente 1,2 millones de defunciones. El SIDA apareció como epidemia mundial en la década de 1980; poco después se descubrió el VIH que se identificö como un **retrovirus**. Los retrovirus poseen un genoma de RNA y un enzima, la transcriptasa inversa, que es capaz de utilizar el RNA para dirigir la síntesis de un DNA complementario. Los esfuerzos realizados para conocer el VIH y desarrollar terapias para la infección por VIH se han beneficiado de décadas de investigación básica, tanto sobre mecanismos enzimáticos como sobre las propiedades de otros retrovirus.

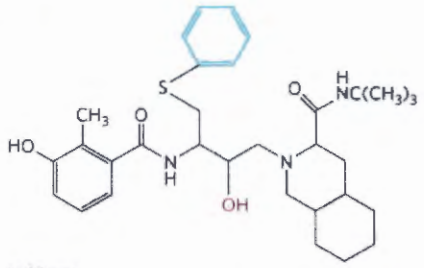
Un retrovirus tal como el VIH tiene un ciclo vital relativamente sencillo (véase la Fig. 26-32). Su genoma de RNA se convierte en un DNA dúplex en varios pasos catalizados por una transcriptasa inversa (descrita en el Capítulo 26). A continuación el DNA dúplex se inserta en un cromosoma del núcleo de la célula huésped mediante el enzima integrasa (descrita en el Capítulo 25). La copia integrada del genoma vírico puede permanecer indefinidamente en estado latente. De forma alternativa, se puede transcribir de nuevo en RNA que se puede traducir a proteínas necesarias para construir nuevas partículas de virus. La mayoría de genes víricos se traducen dando grandes polipéptidos que son cortados por la protesa del VIH en las proteínas individuales requeridas para formar el virus (véase la Fig. 26-33). En este ciclo sólo hay tres enzimas clave: la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa. De este modo estos enzimas representan las dianas más prometedoras para los fármacos.

Existen cuatro subclases principales de proteasas. Serina proteasas, tales como la quimotripsina y la tripsina, y cisteína proteasas (en las que una Cys tiene un papel catalítico similar al de la Ser del sitio activo) que actúan a través de complejos enzima-sustrato covalentes; no así las aspartil proteasas y las metaloproteasas. La proteasa del VIH es una aspartil proteasa. Dos residuos Asp del sitio activo facilitan un ataque directo del agua sobre el enlace peptídico que se ha de romper **(Fig. 6-24)**. El producto inicial del ataque por el agua sobre el grupo carbonilo es un intermedio tetraédrico inestable, muy similar al que hemos visto en la reacción de la quimotripsina. Este intermedio está próximo tanto en energía como en estructura al estado de transición. Los fármacos que se han desarrollado como inhibidores de la proteasa del VIH forman complejos no covalentes con el enzima, pero lo hacen de forma tan fuerte que pueden considerarse inhibidores irreversibles. La unión fuerte proviene, en parte, de su diseño como análogos del estado de transición. El éxito de estos medicamentos pone de relieve un punto que vale la pena resaltar. Los principios catalíticos que hemos estudiado en este capítulo no son simplemente ideas abstrusas que se han de memorizar, sino que su aplicación salva vidas.

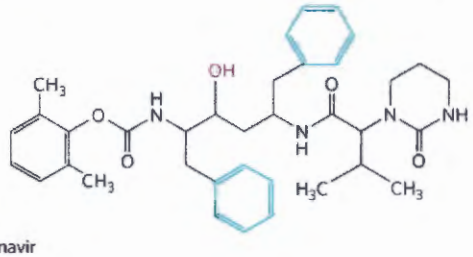
La proteasa del VIH rompe enlaces peptídicos con mayor eficiencia entre residuos Phe y Pro. Así el sitio activo tiene una bolsa que une aminoácidos aromáticos vecinos al grupo que se ha de cortar. En la **Figura 6-25** se muestran las estructuras de varios inhbibidores de la proteasa del VIH. Aunque las estructuras parecen variadas, todas ella comparten una estructura núcleo: una cadena lateral con un grupo hidroxilo próximo a una rama



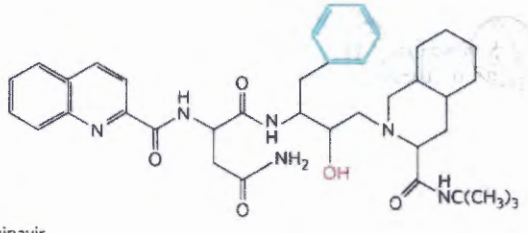
Indinavir



Nelfinavir



Lopinavir



Saquinavir

FIGURA 6-25 Inhibidores de la proteasa de VIH. El grupo hidroxilo (rojo) actúa como análogo del estado de transición simulando el oxígeno del intermedio tetraédrico. El grupo bencilo adyacente (azul) ayuda a posicionar adecuadamente el medicamento en el sitio activo.

que contiene un grupo bencilo. Este ordenamiento dirige el grupo bencilo a una bolsa de unión aromática (hidrofóbica). El grupo hidroxilo adyacente simula el oxígeno cargado negativamente en el intermdio tetraédrico de la reacción normal, con lo que proporciona un análgo del estado de transición. El resto de la estructura del inhibidor se diseñó de manera tal que encajase y se uniese a diversas hendiduras a lo largo de la superficie del enzima aumentando así la unión global. La existencia de estos fármacos tan efectivos ha aumentado notablemente la supervivencia y calidad de vida de millones de personas con VIH y SIDA. A principios de 2015, 15 millones de personas de las aproximadamente 37 millones infectadas por VIH estaban recibiendo tratamiento antirretroviral. ■

En la hexoquinasa se produce un encaje inducido durante la unión del sustrato

La hexoquinasa de levadura (M_r 107.862) es un enzima bisustrato que cataliza la reacción reversible

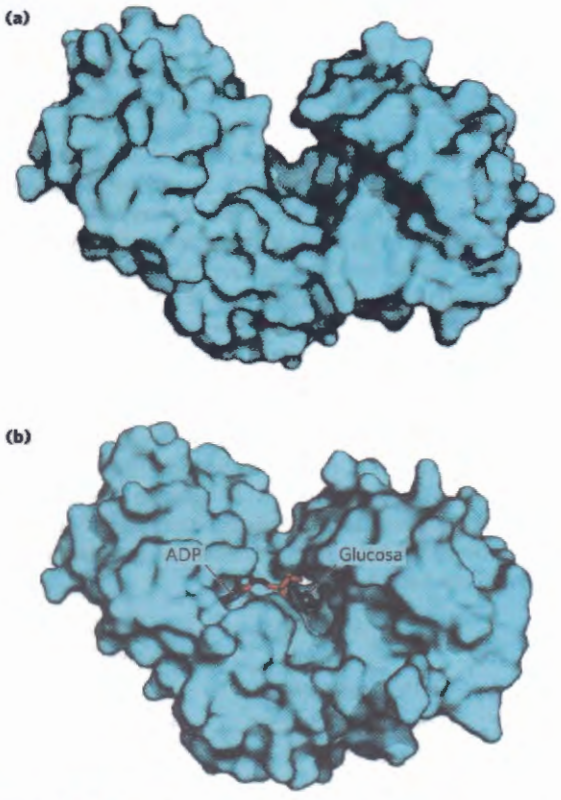
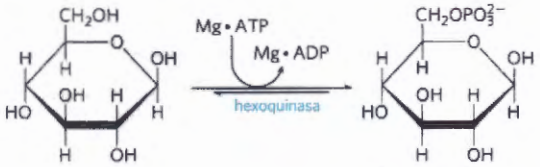


FIGURA 6-26 Encaje inducido en la hexoquinasa (a) La hexoquinasa tiene una estructura en forma de U. **(b)** Los extremos se acercan en un cambio de conformación inducido por la unión de la D-glucosa [Fuentes: (a) PDB ID 2YHX, C.M. Anderson et al., *J. Mol. Biol.* 123: 15, 1978. (b) PDB ID 2E2O modelado con ADP procedente de PDB ID 2E2Q, H. Nishimasu et al., *J. Biol. Chem.* 282, 9923, 2007.)



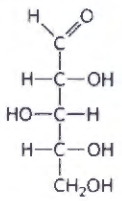
β-D-Glucosa Glucosa 6-fosfato

El ATP y el ADP se unen siempre al enzima formando un complejo con el ión metálico de Mg^{2+}.

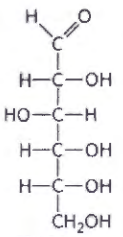
El hidroxilo en la posición C-6 de la molécula de glucosa (al cual se transfiere el γ-fosfato del ATP durante la reacción de la hexoquinasa) es similar en reactividad química al agua, la cual penetra libremente en el sitio activo de la glucosa. No obstante, la hexoquinasa favorece la unión con la glucosa en un factor de 10^6. El enzima puede discriminar entre la glucosa y el agua gracias a un cambio de conformación que se produce en el enzima cuando se une el sustrato correcto **(Fig. 6-26)**. La hexoquinasa constituye, por tanto, un buen ejemplo de encaje inducido. Cuando no hay glucosa, el enzima se encuentra en una conformación inactiva, con las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo en una posición no adecuada para la reacción. Cuando se fijan la glucosa (pero no el agua) y Mg·ATP, la energía de fijación que se produce en esta interacción

induce un cambio hacia la conformación catalíticamente activa del enzima.

Los estudios cinéticos han reforzado esta conclusión. El azúcar de cinco carbonos xilosa, similar estereoquímicamente a la glucosa pero con un carbono menos, se une a la hexoquinasa, pero lo hace en una posición donde no puede ser fosforilada. Sin embargo, la adición de xilosa a la mezcla de reacción aumenta la velocidad de hidrólisis de ATP. Evidentemente, la fijación de xilosa es suficiente para inducir un cambio en la hexoquinasa a su conformación activa, por lo que el enzima resulta "engañado" para que fosforile agua. La reacción de la hexoquinasa también ilustra que la especificidad enzimática no siempre es un simple problema de fijación de un compuesto en lugar de otro. En el caso de la hexoquinasa, se observa especificidad no en la formación del complejo ES, sino en las velocidades relativas de las siguientes etapas catalíticas. El agua no es excluida del sitio activo, pero las velocidades de reacción aumentan considerablemente en presencia de grupos fosforilo aceptores funcionales (glucosa).



Xilosa

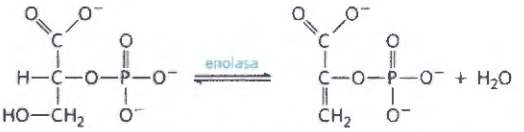


Glucosa

El encaje inducido no es más que un aspecto del mecanismo catalítico de la hexoquinasa; al igual que la quimotripsina, la hexoquinasa utiliza diversas estrategias catalíticas. Por ejemplo, los residuos aminoácidos del sitio activo (los que se posicionan mediante el cambio de conformación que sigue a la fijación del sustrato) participan en la catálisis ácido-base general y en la estabilización del estado de transición.

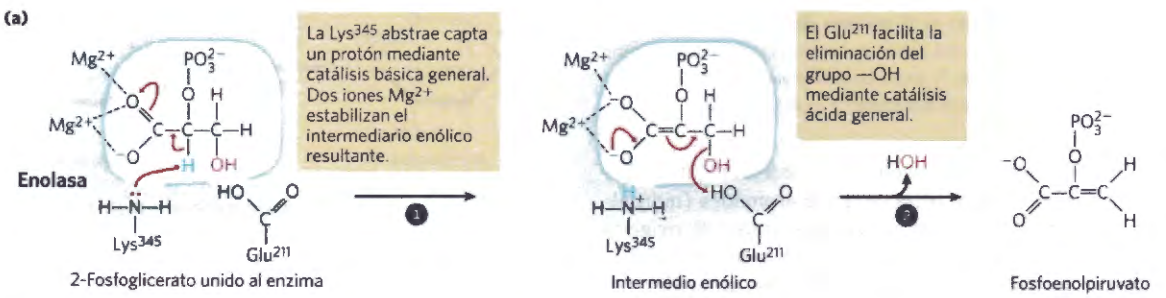
El mecanismo de reacción de la enolasa requiere la presencia de iones metálicos

Otro enzima glucolítico, la enolasa, cataliza la deshidratación reversible del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:



2-Fosfoglicerato Fosfoenolpiruvato

La reacción constituye un ejemplo de la utilización de un cofactor enzimático, un ión metálico en este caso (en el Recuadro 6-3 se incluye un ejemplo de función de un coenzima). La enolasa de levadura (M_r 93.316) es un dímero con 436 residuos aminoácidos por subunidad. La reacción de la enolasa ilustra un tipo de catálisis por ión metálico y proporciona un ejemplo adicional de catálisis ácido-base general y de estabilización del estado de transición. La reacción tiene lugar en dos etapas **(Fig. 6-27a)**. En primer lugar, el residuo Lys^{345} actúa como un catalizador básico general, sustrayendo un protón del C-2 del 2-fosfoglicerato; a continuación, el Glu^{211} actúa como un catalizador ácido general, cediendo un protón al grupo —OH saliente. El protón en el C-2 del 2-fosfoglicerato no es muy acídico por lo que no se extrae fácilmente por la Lys^{346}. Sin embargo, los átomos de oxígeno electronegativos del grupo carboxilo adyacente extraen electrones de C-2, con lo que los protones adheridos son algo más lábiles. En el sitio activo del enzima, el grupo carboxilo del 2-fosfoglicerato experimenta interacciones iónicas fuertes con dos iones Mg^{2+}



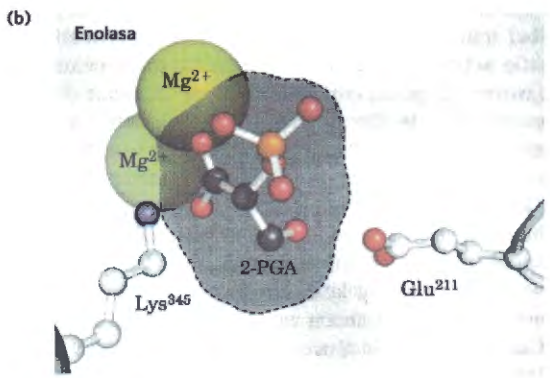


FIGURA DE MECANISMO 6-27 Reacción en dos pasos catalizada por la enolasa. (a) Mecanismo mediante el que se convierte el 2-fosfoglicerato (2-PGA) en fosfoenolpiruvato por la enolasa. El grupo carboxilo del 2-PGA está coordinado por dos iones magnesio en el sitio activo. **(b)** El sustrato, 2-PGA, en relación a los iones magnesio, Lys^{345} y Glu^{211} en el sitio activo de la enolasa (sombreado en gris). El nitrógeno se muestra en azul y el fósforo en naranja; no se muestran los átomos de hidrógeno [Fuente: (b)PDB ID 1ONE, T.M.Larsen et al., *Biochemistry* 35:4349, 1996.)

unidos (Fig. 6-27b), lo que aumenta fuertemente la retirada de electrones por el carboxilo. A medida que se forma el intermedio enolato inestable, los iones metálicos actúan seguidamente apantallando las dos cargas negativas (sobre los átomos de oxígeno del carboxilo) que existen efímeramente muy cerca una de otra. Enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoácidos del sitio activo también contribuyen al mecanismo global. Las diversas interacciones estabilizan efectivamente tanto el intermedio enolato como el estado de transición que precede a su formación.

La lisozima utiliza dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas

La lisozima es un agente antibacteriano natural que se encuentra en las lágrimas y en la clara del huevo. La lisozima de clara de huevo de gallina (M_r 14.296) es un monómero de 129 residuos aminoácidos. Fue el primer enzima del que se determinó la estructura tridimensional, a cargo de David Phillips y colaboradores en 1965. En la estructura se observan cuatro enlaces disulfuro estabilizadores y una hendidura que contiene el sitio activo **(Fig. 6-28a)**. Más de cinco décadas de investigación han permitido obtener una imagen detallada sobre la estructura y la actividad del enzima, además de una interesante historia sobre el progreso de la ciencia bioquímica.

El sustrato de la lisozima es un péptidoglucano, un glúcido que se encuentra en muchas paredes bacterianas. La lisozima rompe el enlace glucosídico C—O (β1→4) (véase la p. 258) entre los dos tipos de azúcares de la molécula, el ácido *N*-acetilmurámico (Mur2Ac) y la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), frecuentemente denominados NAM y NAG, respectivamente, en la literatura científica sobre enzimología (Fig. 6-28b). Seis

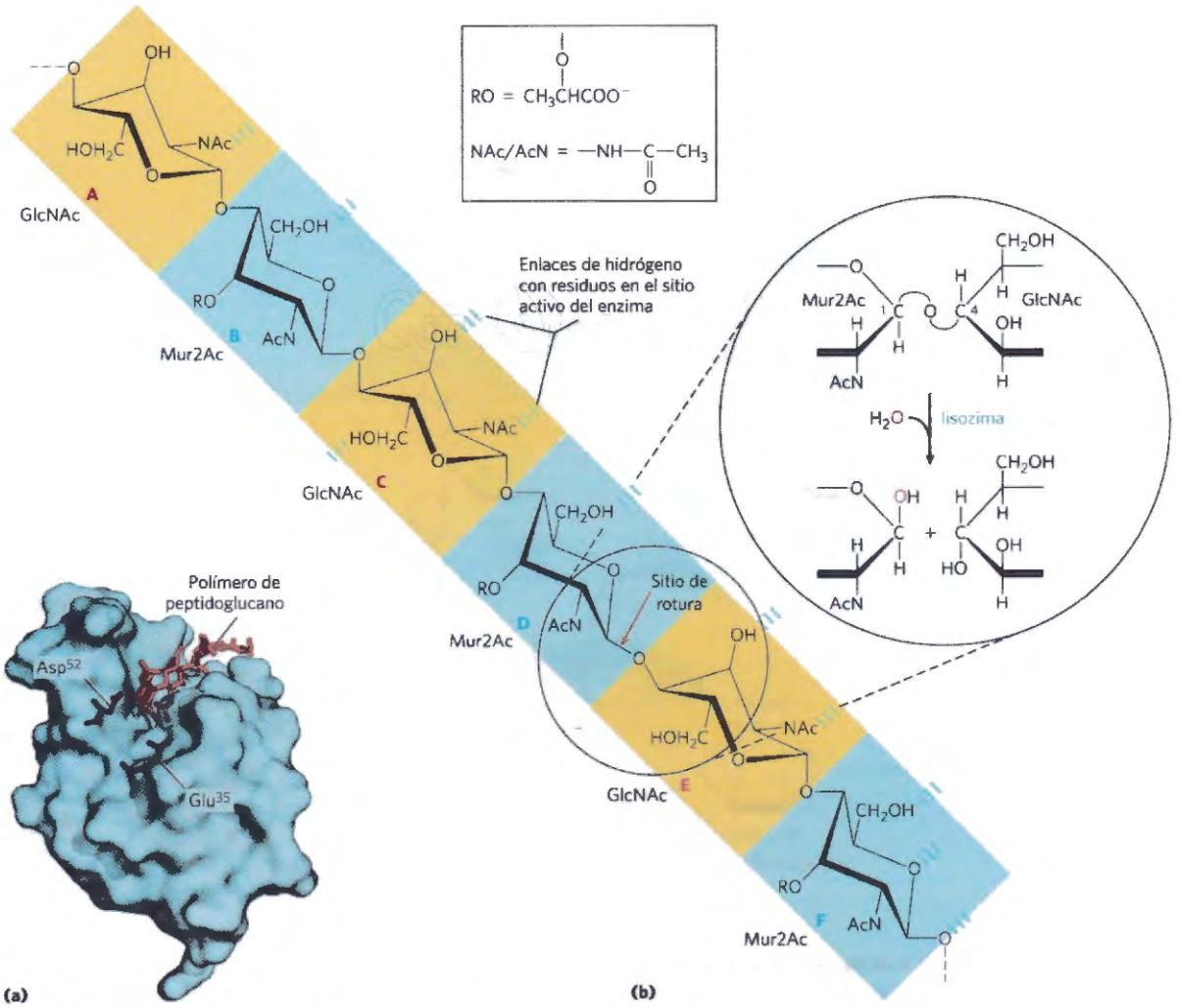


FIGURA 6-28 La lisozima de clara de huevo y la reacción que cataliza. (a) Representación de la superficie del enzima con los residuos del sitio activo Glu^{35} y Asp^{52} mostrados como estructura de varillas negras y el sustrato unido mostrado en rojo. Obsérvese que el enzima cristalizado era un mutante, con Gln en lugar de Glu^{35} véase la pág. 223); la etiqueta aquí se refiere al residuo del tipo salvaje. **(b)** Reacción catalizada por la lisozima de clara de huevo. Se muestra un segmento del polímero de péptidoglucano y los sitios de fijación de la lisozima A a F están sombreados. Se rompe el enlace glucosídico C—O entre los residuos de azúcar unidos a los sitios D y E, tal como indica la flecha roja. La reacción hidrolítica se muestra en el inserto, en el que se muestra en rojo el destino del átomo de oxígeno del H_2O. Mur2Ac es el ácido *N*-acetilmurámico; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina. RO- representa un grupo lactilo (ácido láctico); -Nac y AcN-, un grupo *N*-acetilo (véase la clave). [Fuente: (a) PDB ID 1LZE, K. Maenaka et al., *J. Mol. Biol.* 247:281, 1995.]

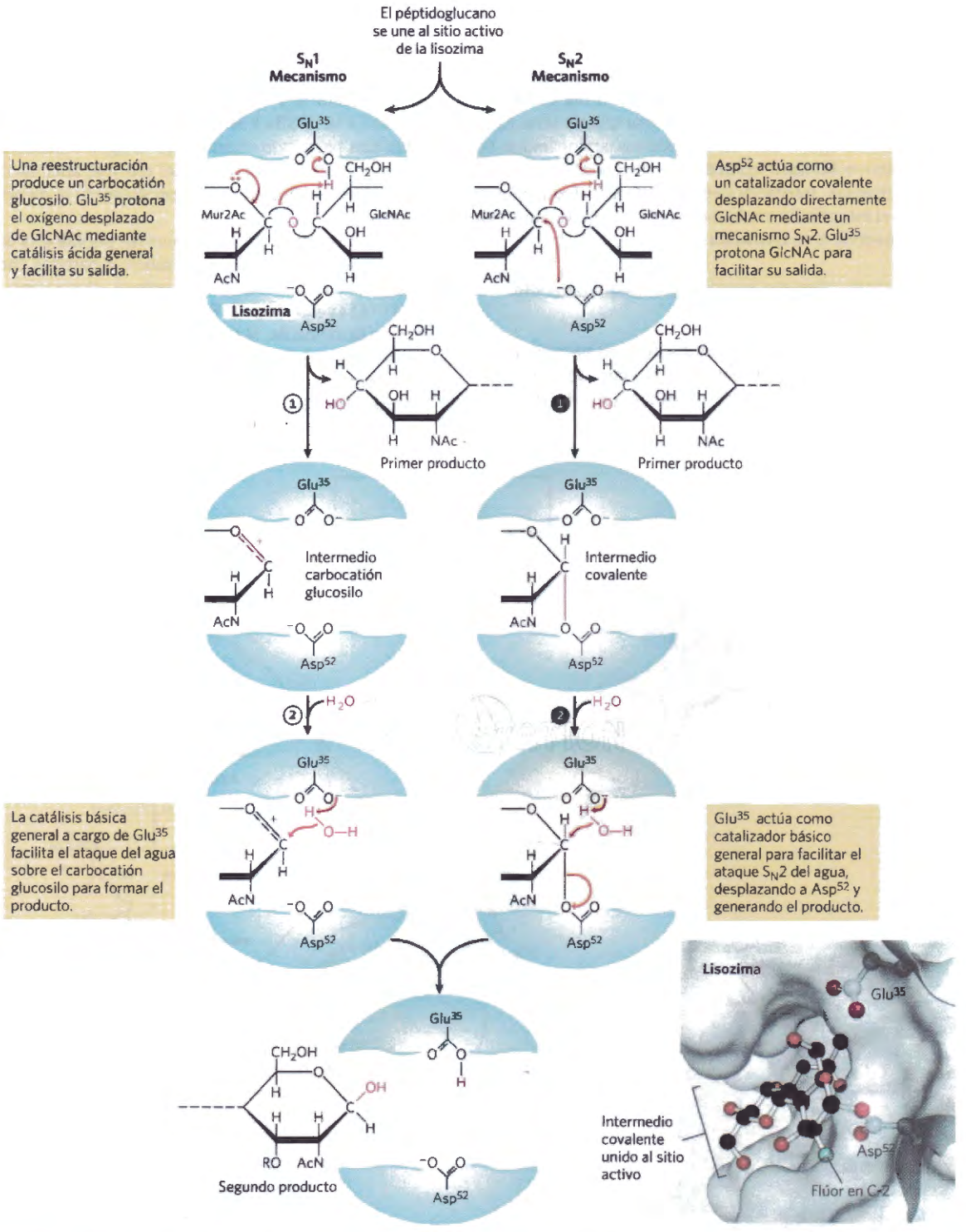


FIGURA DE MECANISMO 6-29 Reacción de la lisozima. En esta reacción (descrita en el texto), el agua introducida en el producto en C-1 de Mur2Ac está en la misma configuración que el enlace glucosídico original. La reacción es, por tanto, una sustitución molecular con retención de configuración. **(a)** Dos mecanismos propuestos explican potencialmente la reacción global y sus propiedades. La ruta S_N1 (izquierda) es el mecanismo original de Phillips. La ruta S_N2 (derecha) es el mecanismo más consistente con los datos actuales. **(b)** Representación de la superficie del sitio activo de la lisozima con el intermedio enzima-sustrato covalente mostrado como estructura de bolas y varillas. Las cadenas laterales de los residuos del sitio activo se muestran en estructura de bolas y varillas que sobresalen de las cintas del diagrama [Fuente: PDB ID 1H6M, D.J. Vocadlo et al., *Nature* 412: 835, 2001.]

residuos alternos de Mur2Ac y GlcNAc del péptidoglucano se unen al sitio activo en los sitios de unión marcados con las letras A a F. La construcción de modelos moleculares ha mostrado que la cadena lateral lactilo de Mur2Ac no puede acomodarse en los sitios C y E, por lo que su unión se restringe a los sitios B, D y F. Sólo se rompe uno de los enlaces glucosídicos unidos, el que se encuentra entre un residuo Mur2Ac en el sitio D y un residuo GlcNAc en el sitio E. Los aminoácidos catalíticos clave del sitio activo son Glu^{35} y Asp^{52} **(Fig. 6-29a)**. La reacción es una sustitución nucleofílica en la que un –OH del agua reemplaza al GlcNAc en la posición C-1 de Mur2Ac.

Después de la identificación de los residuos del sitio activo y de la obtención de la estructura detallada del enzima, en los años 1960 parecía que el camino hacia la comprensión del mecanismo de reacción quedaba expedito. Sin embargo, durante cuatro décadas no fue posible obtener pruebas definitivas a favor de ningún mecanismo determinado. Existen dos mecanismos químicamente razonables que podrían dar lugar a los productos observados en la rotura de enlaces glucosídicos mediada por la lisozima. Phillips y colaboradores propusieron un mecanismo disociativo (de tipo S_N1) (Fig. 6-29a, izquierda), en el que se produce en primer lugar la disociación de GlcNAc en el paso ① , dejando un intermedio catión glucosilo (un carbocatión). En este mecanismo, la GlcNAc saliente es protonada mediante catálisis ácida general por el Glu^{35}, localizado en una bolsa hidrofóbica que le confiere un pK_a inusualmente elevado a su grupo carboxilo. El carbocatión se estabiliza por resonancia con el oxígeno del anillo adyacente y mediante interacción electrostática con la carga negativa del Asp^{52} cercano. En el paso ②, una molécula de agua ataca el C-1 de Mur2Ac para dar el producto. El mecanismo alternativo (Fig. 6-29a, derecha) supone dos pasos de desplazamiento directo (del tipo S_N2) consecutivos. En el paso ❶, el Asp^{52} ataca el C-1 de Mur2Ac y desplaza la GlcNAc. Al igual que en el primer mecanismo, el Glu^{35} actúa como ácido general protonando la GlcNAc saliente. En el paso ❷ , una molécula de agua ataca al C-1 de Mur2Ac, desplazando al Asp^{52} y generando el producto.

El mecanismo de Phillips (S_N1) fue ampliamente aceptado durante más de tres décadas. Sin embargo, siguió existiendo cierta controversia y continuaron los experimentos. A veces, el método científico hace que se adelante lentamente en algunos temas por lo que puede ser difícil diseñar un experimento realmente esclarecedor. Algunos de los primeros argumentos desfavorables al mecanismo de Phillips eran sugerentes pero no totalmente persuasivos. Por ejemplo, se suponía que la vida media del catión glucosilo propuesto en el mecanismo era de 10^{-12} segundos, sólo un poco mayor que una vibración molecular y no lo suficientemente duradera como para permitir la necesaria difusión de otras moléculas. Más importante todavía, la lisozima es un miembro de la familia de enzimas que actúan con "retención de la configuración", y que catalizan reacciones en las que el producto tiene la misma configuración anomérica que el sustrato (las configuraciones anoméricas de los glúcidos se examinan en el Capítulo 7); se sabe que estos enzimas presentan intermedios covalentes reactivos tales como el propuesto en el mecanismo S_N2 alternativo. Por todo ello, el mecanismo de Phillips contradecía los datos experimentales de enzimas estrechamente relacionados.

Un experimento a cargo de Stephen Withers y colaboradores en 2001 escoró la discusión decididamente a favor de la ruta S_N2. Utilizando un enzima mutante (con el residuo 35 cambiado de Glu a Gln) y sustratos artificiales para que, combinados, dieran lugar a un descenso en la velocidad de los pasos clave de la reacción, estos investigadores fueron capaces de estabilizar el elusivo intermedio covalente. Ello les permitió a la vez observar el intermedio directamente mediante espectrometría de masas y cristalografía de rayos X (Fig. 6-29b).

¿Puede considerarse que el mecanismo de la lisozima está ya demostrado? No. Un aspecto clave del método científico, tal como argumentó Albert Einstein en una ocasión, es "No puede haber experimentos suficientes para demostrar que estoy en lo cierto; en cambio, un solo experimento puede demostrar que estoy equivocado". En el caso del mecanismo de la lisozima se podría argumentar, como ya se ha hecho, que los sustratos artificiales con los carbonos C-1 y C-2 sustituidos con flúor que fueron utilizados para estabilizar el intermedio covalente podrían haber alterado el camino de la reacción. La elevada electronegatividad del flúor podría desestabilizar un ión oxicarbenio ya electrodeficiente en el intermedio catión glucosilo que podría aparecer en un mecanismo S_N1. Sin embargo, la ruta S_N2 es, por ahora, el mecanismo más acorde con los datos disponibles.

La comprensión de los mecanismos enzimáticos permiter obtener antibióticos útiles



La penicilina fue descubierta en 1928 por Alexander Fleming, pero fueron necesarios 15 años más para comprender bien este compuesto relativamente inestable y poder utilizarlo como agente farmacológico para tratar infecciones bacterianas. La penicilina interfiere en la síntesis del péptidoglucano, componente principal de la pared celular rígida que protege a las bacterias de la lisis osmótica. El péptidoglucano está formado por polisacáridos y péptidos entrelazados mediante diversos pasos que incluyen una reacción a cargo de una transpeptidasa **(Fig. 6-30)**. Ésta es la reacción inhibida por la penicilina y otros compuestos relacionados **(Fig. 6-31a)**, todos los cuales son inhibidores irreversibles de la transpeptidasa, que pueden unirse al sitio activo a través de un segmento que mimetiza una conformación de la D-Ala-D-Ala del precursor del péptidoglucano. El enlace peptídico del precursor es reemplazado por un anillo de β-lactama, altamente reactivo. Cuando la penicilina se une a la transpeptidasa, una Ser del sitio activo ataca el grupo carbonilo del anillo de β-lactama y genera un aducto covalente entre la penicilina y el enzima. Sin embargo, el grupo saliente permanece unido porque está enlazado mediante lo que resta del anillo de β-lactama (Fig. 6-31b). El complejo covalente inactiva el enzima irreversiblemente. Ello da lugar, a su vez, al bloqueo de la síntesis de la pared celular bacteriana, y la mayoría de bacterias mueren debido a la rotura de la frágil membrana interna a causa de la presión osmótica.

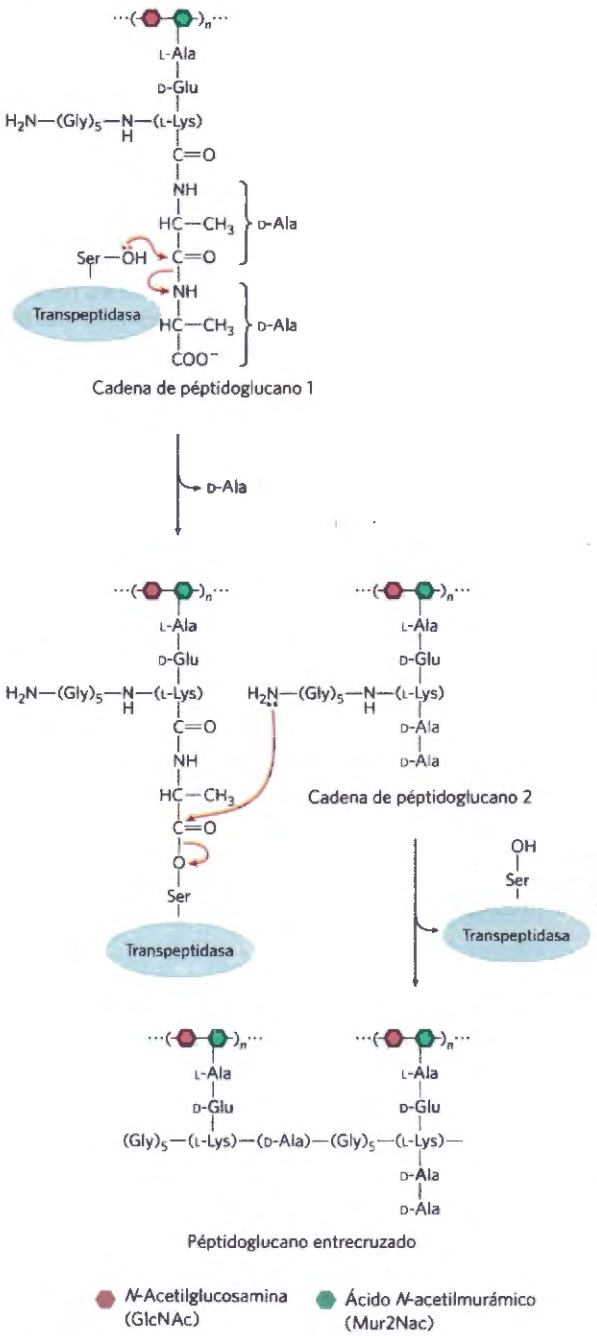


FIGURA 6-30 Reacción de la transpeptidasa. Esta reacción, que une dos precursores de péptidoglucano en un gran polímero, está facilitada por una Ser del sitio activo y un mecanismo de catálisis covalente similar al de la quimotripsina. Observe que el péptidoglucano es una de las pocas moléculas naturales que presentan D-aminoácidos. La Ser del sitio activo ataca el carbonilo del enlace peptídico entre los dos residuos D-Ala, creando un enlace éster covalente entre el sustrato y el enzima y la liberación del residuo D-Ala terminal. Un grupo amino del segundo precursor de péptidoglucano ataca a continuación este enlace éster, desplazando el enzima y uniendo los dos precursores.

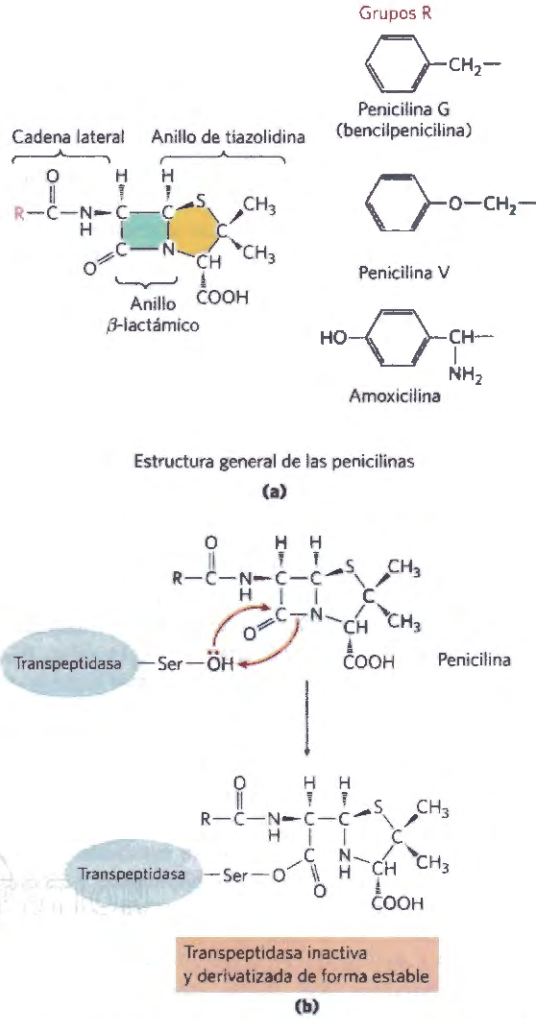


FIGURA 6-31 Inhibición de la transpeptidasa por antibióticos β-lactámicos. (a) Los antibióticos β-lactámicos tienen un anillo de tiazolidina de cinco átomos fusionado a otro anillo β-lactámico de cuatro átomos. Este último está tenso e incluye un grupo amida que juega un papel central en la inactivación de la síntesis de péptidoglucanos. El grupo R varía según el tipo de penicilina. La penicilina G fue la primera en ser aislada y sigue siendo una de las más efectivas, pero se degrada por el ácido del estómago y debe administrarse mediante una inyección. La penicilina V es casi tan efectiva y es estable en condiciones ácidas por lo que se puede administrar por vía oral. La amoxicilina tiene un espectro de efectividad amplio, se administra oralmente y es el antibiótico β-lactámico más prescrito. **(b)** El ataque sobre la parte amida del anillo β-lactámico por una Ser del sitio activo de la transpeptidasa da lugar a un producto covalente acil-enzima. Éste se hidroliza tan lentamente que la formación del aducto es prácticamente irreversible, con lo que la transpeptidasa permanece inactivada.

El uso de la penicilina y sus derivados por parte del ser humano ha dado lugar a la evolución de cepas de bacterias patógenas que expresan **β-lactamasas (Fig. 6-32a)**, enzimas que rompen antibióticos β-lactámicos inactivándolos. De esta manera, las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos. Los genes de estos enzimas se han distribuido muy rápidamente entre la población bacteriana sometida a la presión selectiva impuesta por el uso (y a menudo abuso) de los antibióticos β-lactámicos. La medicina humana respondió con el desarrollo de compuestos tales como el ácido clavulánico, un inactivador suicida que inactiva irreversiblemente las β-lactamasas (Fig. 6-32b). El ácido clavulánico imita la estructura de un antibiótico β-lactámico y forma un aducto covalente con una Ser del sitio activo de la β-lactamasa. Ello da lugar a una reestructuración que

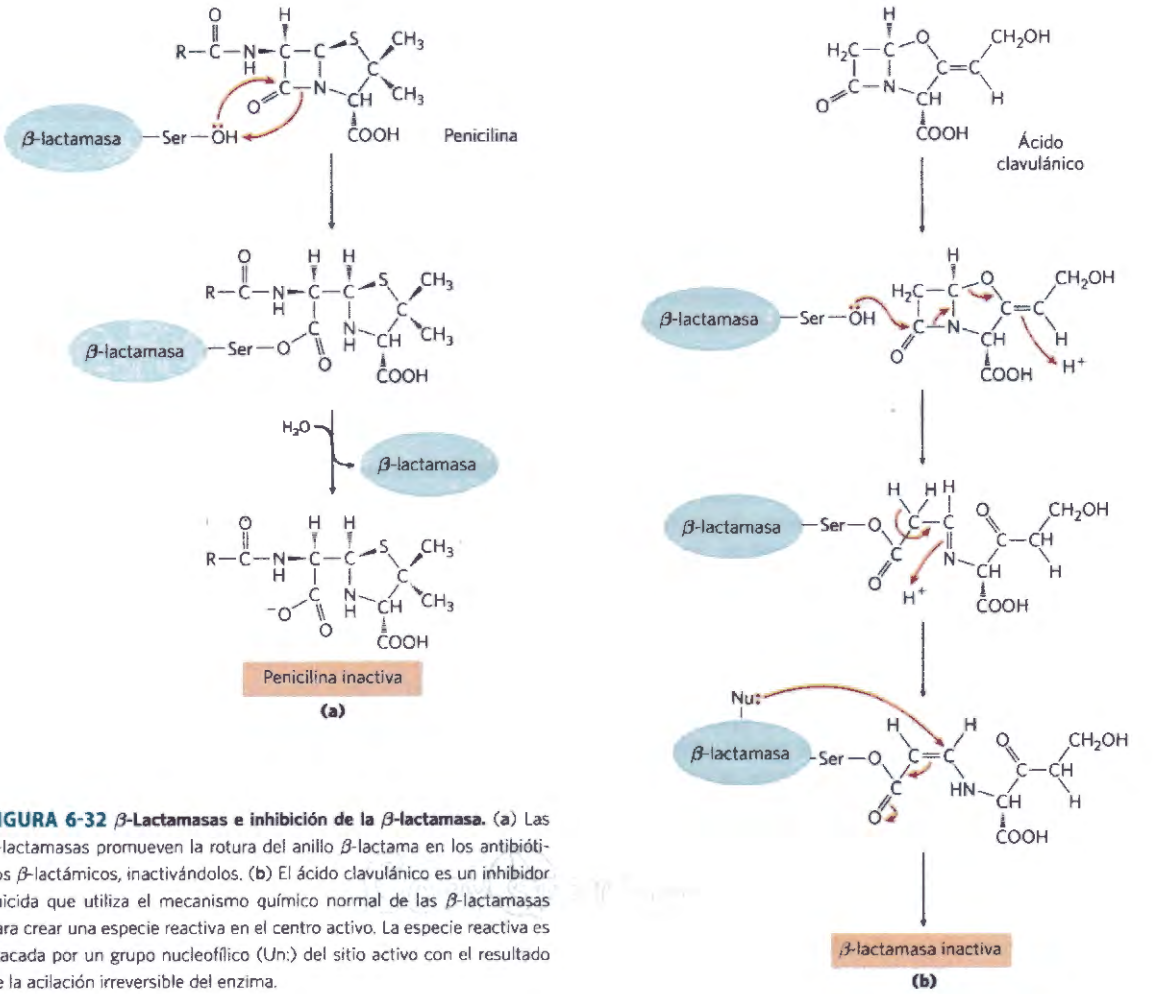


FIGURA 6-32 β-Lactamasas e inhibición de la β-lactamasa. (a) Las β-lactamasas promueven la rotura del anillo β-lactama en los antibióticos β-lactámicos, inactivándolos. (b) El ácido clavulánico es un inhibidor suicida que utiliza el mecanismo químico normal de las β-lactamasas para crear una especie reactiva en el centro activo. La especie reactiva es atacada por un grupo nucleofílico (Un:) del sitio activo con el resultado de la acilación irreversible del enzima.

genera un derivado mucho más reactivo que, a su vez, es atacado a continuación por otro nucleófilo del sitio activo que da lugar a una acilación irreversible del enzima inactivándolo. La amoxicilina y el ácido clavulánico se combinan en una formulación farmacéutica de uso generalizado llamada Augmentine. El ciclo de guerra química entre el ser humano y las bacterias continúa sin descanso. Se han descubierto ya cepas de bacterias patógenas resistentes tanto a la amoxicilina como al ácido clavulánico (lo que refleja la existencia de mutaciones en la β-lactamasa que le impiden reaccionar con el ácido clavulánico). El desarrollo de nuevos antibióticos será muy probablemente una industria en crecimiento en el próximo futuro. ■

RESUMEN 6.4 Ejemplos de reacciones enzimáticas

- La quimotripsina es una serina proteasa con un mecanismo bien conocido que comprende catálisis ácido-base general, catálisis covalente y estabilización del estado de transición.
- La hexoquinasa proporciona un ejemplo excelente del encaje inducido como medio para explotar la energía de fijación del sustrato.
- La reacción de la enolasa tiene lugar mediante catálisis por ión metálico.
- La lisozima utiliza catálisis covalente y catálisis ácida general al promover dos reacciones de desplazamiento nucleofílico sucesivas.
- El conocimiento de los mecanismos enzimáticos permite el desarrollo de fármacos inhibidores de la acción enzimática.

6.5 Enzimas reguladores

En el metabolismo celular hay grupos de enzimas que funcionan conjuntamente en rutas secuenciales para llevar a cabo un proceso metabólico determinado, tal como la conversión, en varias reacciones, de la glucosa en lactato o la síntesis a través de múltiples reacciones de un aminoácido a partir de precursores sencillos. En tales sistemas enzimáticos, el producto de la reacción de un enzima se convierte en el sustrato del siguiente.

La mayor parte de los enzimas de cada ruta metabólica siguen los comportamientos cinéticos ya descritos. Sin embargo, en cada ruta hay uno o más enzimas que tienen un mayor efecto sobre la velocidad de la secuencia global de reacciones. Estos **enzimas reguladores** muestran una actividad catalítica mayor o menor en respuesta a ciertas señales. Los ajustes en la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas reguladores y, por tanto, en la velocidad de la secuencia metabólica entera, permiten que la célula se adapte a las necesidades cambiantes de energía y biomoléculas requeri-

das para su crecimiento y la reparación de sus componentes.

La actividad de los enzimas reguladores se modula de diferentes maneras. Los **enzimas alostéricos** funcionan a través de la unión reversible, no covalente, de compuestos reguladores denominados **moduladores alostéricos** o **efectores alostéricos**, los cuales son generalmente metabolitos pequeños o cofactores. Otros enzimas están regulados por **modificación covalente** reversible. Ambas clases de enzimas reguladores tienden a tener varias subunidades y, en algunos casos, el sitio o sitios reguladores y el sitio activo se encuentran en subunidades separadas. En los sistemas metabólicos existen al menos otros dos mecanismos mediante los que se regula la actividad de los enzimas. Algunos enzimas son estimulados o inhibidos cuando se unen a **proteínas reguladoras** separadas. Otros se activan cuando se eliminan segmentos peptídicos mediante **escisión proteolítica** la cual, a diferencia de la regulación mediada por efectores, es irreversible. En procesos fisiológicos tales como la digestión, la coagulación de la sangre, la acción hormonal y la visión se encuentran ejemplos importantes de estos dos tipos de mecanismos.

El crecimiento y la supervivencia celulares dependen del uso eficaz de los recursos, eficiencia que es posible gracias a la acción de los enzimas reguladores. No hay una regla única que gobierne la existencia de diferentes tipos de regulación en sistemas diferentes. Hasta cierto punto, la regulación alostérica (no covalente) puede permitir el control afinado de las rutas metabólicas que funcionan de modo continuado pero a diferentes niveles de actividad cuando cambian las condiciones celulares. La regulación por modificación covalente puede ser del tipo todo o nada (el caso más común en las roturas proteolíticas) o dar lugar a ligeros cambios en la actividad. En un mismo enzima regulador pueden darse varios tipos de regulación. El resto de este capítulo se dedica a discutir acerca de estos procesos de regulación enzimática

Los enzimas alostéricos experimentan cambios de conformación en respuesta a la unión de moduladores

Tal como hemos visto en el Capítulo 5, las proteínas alostéricas son las que presentan "otras formas" o conformaciones inducidas por la unión de moduladores. El mismo concepto se aplica a ciertos enzimas reguladores, en los que cambios de conformación inducidos por uno o más moduladores interconvierten formas más activas o menos activas del enzima. Los moduladores de enzimas alostéricos pueden ser inhibidores o estimuladores. El mismo sustrato es a menudo el modulador; la regulación en la que el sustrato y el modulador son idénticos se denomina homotrópica. El efecto es similar al de la unión de O_2 a la hemoglobina (Capítulo 5): la unión del ligando, o del sustrato en el caso de los enzimas, origina cambios de conformación que afectan la actividad de otros sitios en la proteína. En la mayoría de casos el cambio de conformación convierte una conformación relativamente inactiva (estado T) en una conformación más activa (estado R). Cuando el modulador es una molécula diferente del sustrato, se dice que el enzima es heterotrópico. Obsérvese que los moduladores alostéricos no se deben confundir con los inhibidores acompetitivos y mixtos. Aunque estos últimos se unen en un segundo sitio del enzima, no inducen necesariamente cambios de conformación entre las formas activas e inactivas, y los efectos cinéticos son distintos.

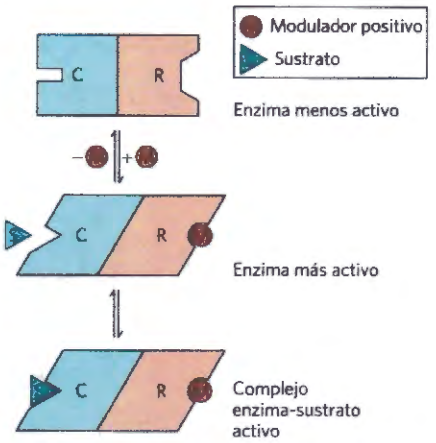
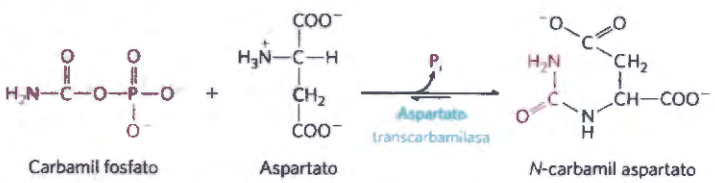


FIGURA 6-33 Interacciones entre subunidades en un enzima alostérico e interacciones con inhibidores y activadores. En muchos enzimas alostéricos el sitio de fijación del sustrato y el sitio, o sitios, de fijación del modulador se encuentran en subunidades diferentes, las subunidades catalíticas (C) y las reguladoras (R), respectivamente. La fijación del modulador (M) positivo (estimulador) a su sitio específico en la subunidad reguladora se comunica a la subunidad catalítica mediante un cambio de conformación. Este cambio hace que la subunidad catalítica sea activa y capaz de fijar el sustrato (S) con mayor afinidad. Al separarse el modulador de la subunidad reguladora, el enzima revierte a su forma inactiva, o menos activa.

Las propiedades de los enzimas alostéricos son significativamente diferentes de las de los enzimas no reguladores sencillos. Algunas de las diferencias son estructurales. Además de sitios activos, los enzimas alostéricos tienen generalmente uno o más sitios reguladores, alostéricos, para la unión del modulador **(Fig. 6-33)**. Del mismo modo que el sitio activo de un enzima es específico para su sustrato, cada sitio regulador es específico para su modulador. Los enzimas con varios moduladores tienen, generalmente, diferentes sitios de fijación específicos para cada uno de ellos. En los enzimas homotrópicos el sitio activo y el sitio regulador son el mismo.

En general los enzimas alostéricos también son mayores y más complejos que los enzimas no alostéricos. La mayoría tienen dos o más subunidades. Un ejemplo clásico es la aspartato transcarbamilasa (a menudo abreviada ATCasa), que cataliza una de las primeras reacciones de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos, la reacción entre el carbamil fosfato y el aspartato que forma carbamil aspartato



La ATCasa tiene 12 cadenas polipeptídicas organizadas en 6 subunidades catalíticas (organizadas en

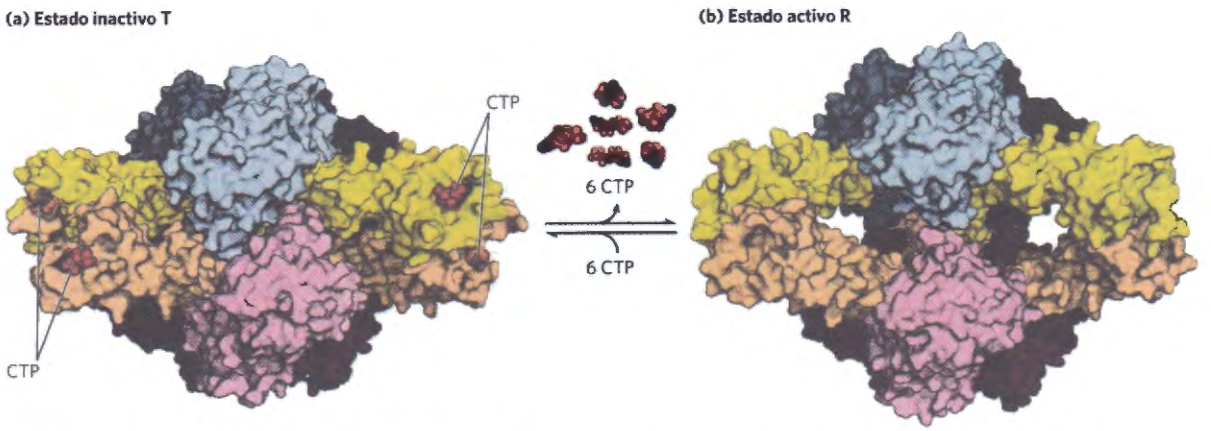


FIGURA 6-34 El enzima regulador aspartato transcarbamilasa. (a) Estado inactivo T y **(b)** estado activo T. Este enzima regulador alostérico tiene dos agrupaciones catalíticas apiladas, cada una de las cuales contiene tres cadenas polipeptídicas catalíticas (en tonos de azul y púrpura) y tres agrupaciones reguladoras cada una con dos cadenas polipeptídicas reguladoras (en rojo y amarillo). Los agrupamientos reguladores forman las puntas de un triángulo (no se ven de manera evidente en esta vista lateral) que rodea las subunidades catalíticas. Los sitios de fijación de los moduladores alostéricos (incluido el CTP) se encuentran en las subunidades reguladoras. La fijación del modulador produce grandes cambios en la conformación y actividad del enzima. En el Capítulo 22 se discute el papel de este enzima en la síntesis de nucleótidos y los detalles de su regulación. [Fuentes: (a) PDB ID 1RAB, R.P. Kosman et al., *Proteins* 15:147, 1993. (b) PDB ID 1F1B, L. Jin et al., *Biochemistry*, 39:8058, 2000.]

forma de 2 complejos triméricos) y 6 reguladoras (organizadas en forma de 3 complejos diméricos). La **Figura 6-34** muestra la estructura cuaternaria de este enzima deducida a partir de análisis de rayos X. Tal como se detalla más adelante, el enzima muestra un comportamiento alostérico ya que las subunidades catalíticas funcionan de modo cooperativo. Las subunidades reguladoras tienen sitios de unión para el ATP y el CTP, que actúan como reguladores positivo y negativo, respectivamente. CTP es uno de los productos finales de la ruta por lo que la regulación negativa por el CTP sirve para limitar la acción de la ATCasa en condiciones en las que el CTP es abundante. Por otro lado, concentraciones elevadas de ATP indican que el metabolismo celular es robusto, la célula crece, por lo que pueden necesitarse más nucleótidos de pirimidina para que se produzca la transcripción del RNA y la replicación del DNA.

Las propiedades cinéticas de los enzimas alostéricos divergen del comportamiento de Michaelis-Menten

Los enzimas alostéricos muestran una relación entre V_0 y [S] que difiere de la cinética de Michaelis-Menten. Aunque se saturan con el sustrato cuando [S] es suficientemente elevada, la mayoría de enzimas alostéricos dan lugar a una curva de saturación sigmoidea cuando se representa V_0 frente a [S] **(Fig. 6-35)**, en lugar de la curva hiperbólica típica de los enzimas no reguladores. En la curva de saturación sigmoidea podemos encontrar un valor de [S] a la que V_0 es mitad de la máxima, pero no nos podemos referir al mismo con la designación K_m ya que el enzima no sigue la relación hiperbólica de Michaelis-Menten. En su lugar se utilizan a menudo los símbolos $[S]_{0,5}$ o $K_{0,5}$ para representar la concentración de sustrato que da la mitad de la velocidad máxima de la reacción catalizada por un enzima alostérico (Fig. 6-35).

El comportamiento cinético sigmoideo es generalmente el reflejo de interacciones cooperativas entre subunidades proteicas. Dicho de otro modo, los cambios en la estructura de una subunidad se traducen en cambios estructurales de las subunidades adyacentes, efecto que es facilitado por interacciones no covalentes en la interfase entre subunidades. Los principios están especialmente bien ilustrados por un no enzima: la fijación de O_2 a la hemoglobina. El comportamiento cinético sigmoideo se explica mediante los modelos concertado y secuencial de interacción de subunidades (véase la Fig. 5-15).

La ATCasa ilustra de manera efectiva tanto el comportamiento cinético alostérico homotrópico como el heterotrópico.La unión de los sustratos, aspartato y carbamil fosfato, al enzima producen de manera gradual una transición desde el estado T relativamente inactivo al estado R más activo. Esto explica el incremento sigmoideo en lugar de hiperbólico de V_0 al aumentar [S]. Una característica de la cinética sigmoidea es que pequeños cambios en la concentración de un modulador se pueden asociar con grandes cambios en la actividad. Como es evidente en la Figura 6-34a, un incremento relativamente pequeño en [S] en la parte de mayor pendiente de la curva provoca un incremento comparativamente grande en V_0.

La regulación alostérica heterotrópica de la ATCasa es producto de sus interacciones con ATP y CTP. En el caso de los enzimas alostéricos heterotrópicos un activador puede hacer que la curva de saturación con el sustrato sea más próxima a la hiperbólica, con un descenso de $K_{0,5}$ pero sin cambios en V_{max}, lo que se traduce en un incremento de velocidad de reacción a una concentración de sustrato fija. En el caso de la ATCasa, esto se produce por la interacción con ATP lo que hace que el enzima muestre una curva de V_0 frente a [S] característica del estado R activo a concentracions de ATP suficientemente elevadas (V_0 es superior a cualquier valor de [S]; véase Fig. 6-35b). Un modulador negativo (un inhibidor) puede producir una curva de saturación de sustrato *más* sigmoidea, con un incremento en $K_{0,5}$, tal como se ilustra por los efectos del CTP sobre la cinética de la ATCasa (véanse las curvas para el modulador

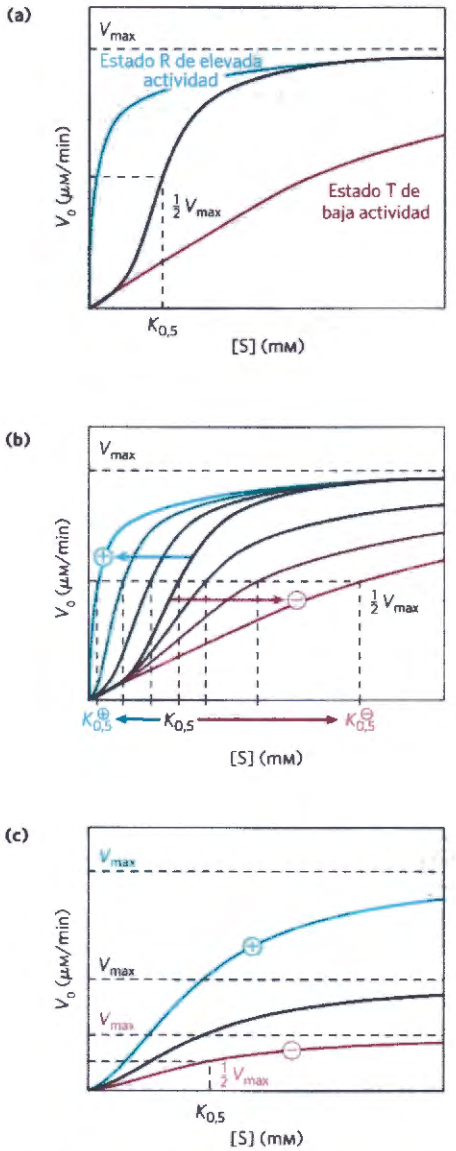


FIGURA 6-35 Curvas de actividad en función del sustrato de enzimas alostéricos representativos. Tres ejemplos de respuestas complejas de enzimas alostéricos a sus moduladores. **(a)** Curva sigmoidea producida por un enzima homotrópico en el que el sustrato también actúa como modulador positivo (estimulador), o activador. Obsérvese el parecido con la curva de saturación por oxígeno de la hemoglobina (véase la Fig. 5-12). La curva sigmoidea es una curva híbrida en la que el enzima está presente mayoritariamente en el estado inactivo T a baja concentración de sustrato, y principalmente en el estado más activo R a elevada concentración de sustrato. Las curvas para los estados T y R puros se representan separadamente en color. La ATCasa muestra un patrón similar a éste **(b)** Efectos de diferentes concentraciones de un modulador positivo (+) y un modulador negativo (-) sobre un enzima alostérico en el que $K_{0,5}$ se altera sin cambio en V_{max}. La curva central muestra la relación sustrato-actividad sin modulador. Para la ATCasa el CTP es un modulador negativo y el ATP un modulador positivo. **(c)** Un caso de modulación menos común en el que se altera V_{max} mientras $K_{0,5}$ se mantiene casi constante.

negativo, Fig. 6-35b). Otros enzimas alostéricos heterotrópicos responden a la presencia de un activador con un incremento de V_{max} pero con poco cambio en $K_{0,5}$ (Fig. 6-35c). Los enzimas alostéricos heterotrópicos muestran, por tanto, diferentes clases de respuesta en sus curvas de actividad frente a sustrato debido a que algunos tienen moduladores inhibidores, otros tienen moduladores activadores y otros (como la ATCasa) los tienen de ambas clases.

Algunos enzimas están regulados por modificación covalente reversible

En otra clase importante de enzimas reguladores la actividad se modula por modificación covalente de uno o más de los residuos aminoácidos de la molécula de enzima. Se han encontrado más de 500 tipos diferentes de modificación covalente de proteínas. Los grupos fosforilo, acetilo, adenililo, uridililo, metilo, amida, carboxilo, miristilo, palmitilo, prenilo, hidroxilo, sulfato y adenosina difosfato ribosilo se cuentan entre los grupos modificadores más comunes **(Fig. 6-36)**. Existen incluso proteínas enteras, como ubiquitina y sumo, que se usan como grupos modificadores especializados. Generalmente, estos grupos se unen y son eliminados del enzima regulador por la acción de otros enzimas. La modificación de un residuo aminoácido de un enzima es equivalente a la introducción de un nuevo aminoácido con propiedades alteradas dentro del enzima. La introducción de una carga puede alterar las propiedades locales del enzima e inducir un cambio de conformación. La introducción de un grupo hidrofóbico puede inducir la asociación con una membrana. Los cambios son a menudo importantes y pueden ser críticos para la función del enzima alterado.

La variedad de modificaciones enzimáticas es demasiado grande para ser cubierta con detalle, pero podemos comentar algunos ejemplos. Un ejemplo de enzima regulado por metilación es el de la proteína aceptora de metilos de la quimiotaxis de las bacterias. Esta proteína forma parte de un sistema que le permite a una bacteria nadar hacia una sustancia atrayente en solución (por ejemplo un azúcar) y alejarse de las sustancias químicas repelentes. El agente metilante es la *S*-adenosilmetionina (adoMet) (véase la Fig. 18-18). La acetilación es otra modificación común que afecta aproximadamente al 80% de las proteínas solubles en eucariotas, entre las que se encuentran muchos enzimas, y que supone la acetilación de sus extremos amino terminales. La ubiquitina se une a las proteínas como un marca que las predestina para su degradación proteolítica (véase la Fig. 27-49). La ubiquitinación puede tener también una función reguladora. Sumo se encuentra unida a muchas proteínas nucleares eucarióticas que intervienen en la regulación de la transcripción, en la estructura de la cromatina y en la reparación del DNA.

La ADP-ribosilación es una reacción especialmente interesante, observada en algunas proteínas; la ADP-ribosa proviene del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (véase la Fig. 8-41). Este tipo de modificación se da en la dinitrogenasa reductasa bacteriana, que regula el importante proceso de la fijación biológica del nitrógeno. Las toxinas de la difteria y del cólera son enzimas que catalizan la ADP-ribosilación (e inactivación) de enzimas o proteínas celulares claves.

La fosforilación es la modificación reguladora más frecuente. Se calcula que un tercio de todas las proteínas de la célula eucariotica están fosforiladas, y que

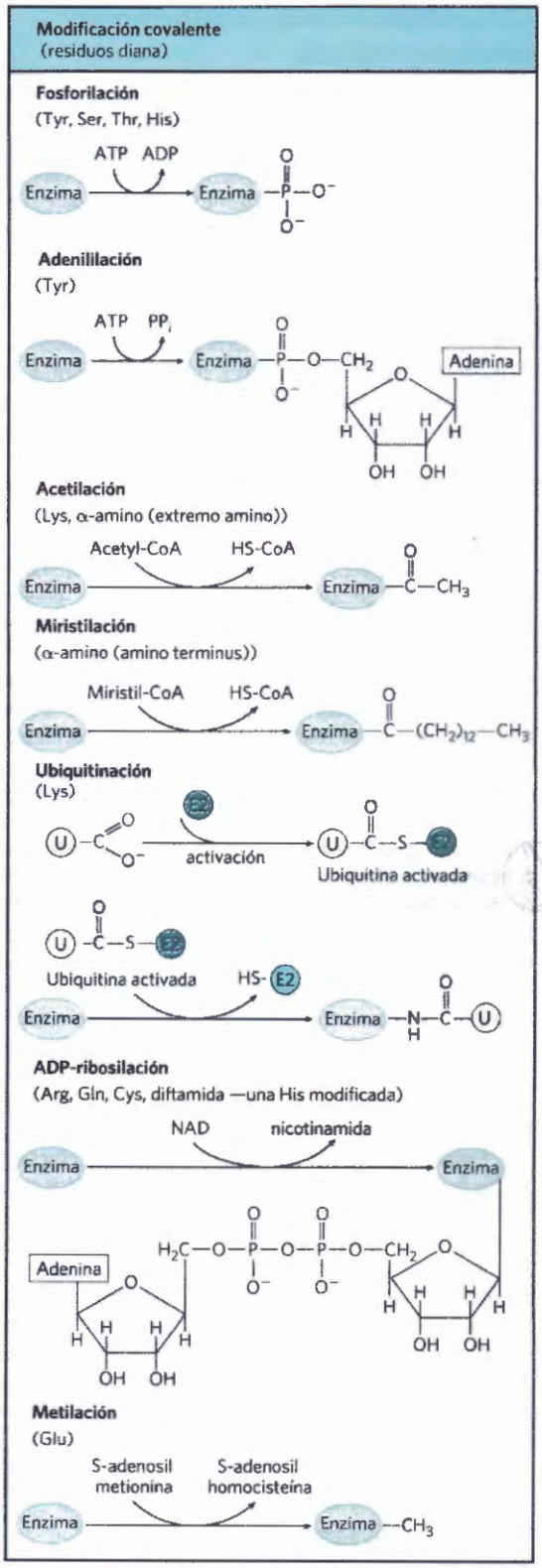


FIGURA 6-36 Algunas reacciones de modificación de enzimas.

prácticamente en todos los procesos reguladores participan uno o (a menudo) muchos pasos de fosforilación. Algunas proteínas tiene sólo un residuo fosforilado, otras presentan varios y algunas tienen docenas de sitios fosforilables. Este tipo de modificación covalente juega un papel central en un gran número de rutas reguladoras, por lo que se discute aquí con cierto detalle. También se discutirá en el Capítulo 12.

A lo largo del texto se irán encontrando todas las modificaciones aquí descritas.

Los grupos fosforilo afectan la estructura y la actividad catalítica de los enzimas

Las **proteína quinasas** catalizan la unión de grupos fosforilo a residuos aminoácidos específicos de una proteína. En el genoma humano se encuentran más de 500 genes que codifican estos enzimas clave. En la reacción, el grupo γ-fosforilo de un nucleósido trifosfato (normalmente ATP) se transfiere a un residuo concreto de Ser, Thr, o Tyr (en ocasiones también His) en la proteína diana. Esto introduce un grupo cargado y voluminoso en una región de la proteína diana que sólo era moderadamente polar. Los átomos de oxígeno de un grupo fosforilo pueden formar enlaces de hidrógeno con uno o varios grupos de la proteína, generalmente los grupos amida de la cadena peptídica al inicio de una hélice α o los grupos guanidinio cargados de un residuo Arg. Las dos cargas negativas de una cadena lateral fosforilada también pueden repeler los residuos cargados negativamente (Asp o Glu). Cuando la cadena lateral modificada se sitúa en una región del enzima critica para su estructura tridimensional, se puede esperar que la fosforilación tenga efectos muy importantes en la conformación de la proteína y, por tanto, en la fijación del sustrato y la catálisis. La eliminación de los grupos fosforilo está catalizada por **fosfoproteína fosfatasas** denominadas simplemente **proteína fosfatasas**.

Un ejemplo importante de regulación enzimática por fosforilación se encuentra en la glucógeno fosforilasa (M_r 94.500) de músculo e hígado (Capítulo 15), que cataliza la reacción

$$\underset{\text{Glucógeno}}{(\text{Glucosa})_n} + P_i \longrightarrow \underset{\text{Cadena de glucógeno acortada}}{(\text{glucosa})_{n-1}} + \text{glucosa 1-fosfato}$$

La glucosa 1-fosfato así formada puede utilizarse para la síntesis de ATP en el músculo o ser convertida en glucosa libre en el hígado. Observe que la glucógeno fosforilasa, aunque añade un fosfato a un sustrato, no es de hecho una quinasa, ya que no utiliza ATP o cualquier otro nucleósido trifosfato como dador de fosforilo en la reracción que cataliza. Es, no obstante, el sustrato de una proteína quinasa que la fosforila. En la siguiente discusión, los grupos fosforilo que nos interesan son los que intervienen en la regulación del enzima y no los de su función catalítica.

La glucógeno fosforilasa se presenta en dos formas: la forma más activa fosforilasa *a* y la forma menos activa fosforilasa *b* **(Fig. 6-37)**. La fosforilasa *a* consta de dos subunidades, cada una de las cuales contiene un residuo Ser específico que está fosforilado en su grupo hidroxilo. Estos residuos serina fosfato son necesarios para alcanzar la actividad máxima del enzima. Los grupos fosforilo se pueden eliminar hidrolíticamente por un enzima diferente denominado fosforilasa fosfatasa:

$$\underset{\text{(más activa)}}{\text{Fosforilasa } a} + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} + 2P_i$$

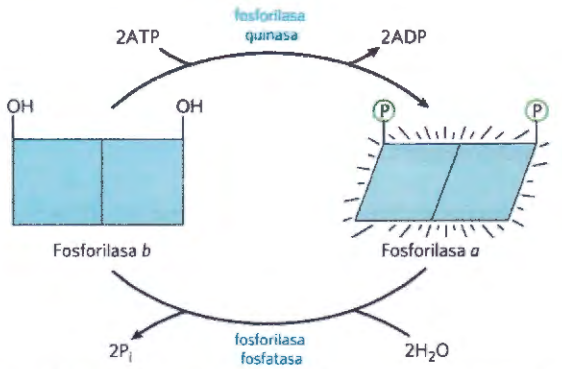


FIGURA 6-37 Regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular por fosforilación. En la forma más activa del enzima, la fosforilasa *a*, se fosforilan residuos Ser específicos, uno en cada subunidad. La fosforilasa *a* se convierte en la fosforilasa *b* menos activa por eliminación enzimática, promovida por la fosfoproteína fosfatasa I (PPI), de esos grupos fosforilo. La fosforilasa *b* puede reconvertirse (reactivarse) en fosforilasa *a* por acción de la fosforilasa quinasa.

En esta reacción la fosforilasa *a* se convierte en fosforilasa *b* mediante la rotura de dos enlaces serina-fosfato covalentes, uno en cada subunidad de la glucógeno fosforilasa.

La fosforilasa *b* puede, a su vez, reactivarse - volver a convertirse covalentemente en fosforilasa *a* activa - por mediación de otro enzima, la fosforilasa quinasa, que cataliza la transferencia de grupos fosforilo desde el ATP a los grupos hidroxilo de los dos residuos específicos de Ser en la fosforilasa *b*:

$$2\text{ATP} + \underset{\text{(menos activa)}}{\text{fosforilasa } b} \longrightarrow 2\text{ADP} + \underset{\text{(más activa)}}{\text{fosforilasa } a}$$

La degradación del glucógeno en el músculo esquelético y en el hígado está regulada por variaciones en las proporciones de las dos formas de la glucógeno fosforilasa. Las formas *a* y *b* difieren en sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria; cuando se interconvierten las dos formas, el sitio activo experimenta cambios de estructura y, en consecuencia, cambios en la actividad catalítica.

La regulación de la glucógeno fosforilasa mediante fosforilación muestra las consecuencias de la adición de un grupo fosforilo tanto en la estructura como en la actividad catalítica. En el estado no fosforilado, cada subunidad de este enzima se pliega de manera que acerca 20 residuos de su extremo amino-terminal, entre los que se incluyen muchos residuos básicos, hacia una región que contiene varios aminoácidos acídicos; esto origina interacciones electroestáticas que estabilizan la conformación. La fosforilación de la Ser^{14} interfiere en esta interacción, forzando el dominio amino-terminal a moverse hacia fuera del entorno acídico y a adoptar una conformación que permite la interacción entre Ⓟ–Ser y varias cadenas laterales de Arg. En esta conformación el enzima es mucho más activo.

La fosforilación de un enzima puede afectar a la catálisis por otra vía: mediante la modificación de la afinidad de fijación del sustrato. Por ejemplo, cuando se fosforila la isocitrato deshidrogenasa (un enzima del ciclo del ácido cítrico; Capítulo 16), la repulsión electrostática del grupo fosforilo inhibe la fijación de citrato (un ácido tricarboxílico) en el sitio activo.

Las fosforilaciones múltiples permiten un control exquisito de la regulación

Los residuos Ser, Thr o Tyr fosforilados en las proteínas reguladoras se presentan dentro de motivos estructurales comunes, en las denominadas secuencias consenso, que son reconocidas por proteína quinasas específicas (Tabla 6-10). Algunas quinasas son basofílicas, prefiriendo fosforilar un residuo que tenga vecinos básicos; otras presentan diferentes preferencias de sustrato, tal como un residuo cercano a una Pro. Sin embargo, la secuencia primaria no es el único factor importante en la determinación de si un residuo será fosforilado o no. El plegamiento proteico acerca residuos distantes en la secuencia primaria; la estructura tridimensional resultante puede determinar el que una proteína quinasa tenga acceso a un residuo determinado y pueda reconocerlo como sustrato. Otro factor que influye en la especificidad de sustrato de ciertas proteína quinasas es la proximidad de otros residuos fosforilados.

La regulación por fosforilación es a menudo complicada. Algunas proteínas tienen secuencias consenso reconocidas por varias proteína quinasas diferentes, cada una de las cuales puede fosforilar la proteína y variar su actividad enzimática. En algunos casos la fosforilación es jerárquica: un determinado residuo se puede fosforilar sólo si un residuo vecino se ha fosforilado primero. Por ejemplo, la glucógeno sintasa, el enzima que cataliza la condensación de monómeros de glucosa para formar glucógeno (Capítulo 15) está inactivada por fosforilación de residuos Ser específicos y su actividad está también modulada por al menos otras cuatro proteína quinasas que fosforilan otros tantos sitios del enzima **(Fig. 6-38)**. El enzima no es, por ejemplo, un sustrato de la glucógeno sintasa quinasa 3 hasta que un sitio ha sido fosforilado por la caseína quinasa II. Algunas fosforilaciones inhiben más que otras la glucógeno sintasa, y algunas combinaciones de fosforilaciones son acumulativas. Estas fosforilaciones reguladoras múltiples proporcionan el potencial para una regulación extremadamente sutil de la actividad enzimática.

Para ser útil como mecanismo regulador efectivo, la fosforilación ha de ser reversible. En general, los grupos fosforilo se añaden y eliminan mediante enzimas diferentes y, por consiguiente, los procesos se pueden regular independientemente. Las células contienen una familia de fosfoproteína fosfatasas que hidrolizan específicamente los ésteres Ⓟ–Ser, Ⓟ–Thr y Ⓟ–Tyr, liberando P$_i$. Las fosfoproteína fosfatasas conocidas hasta el momento actúan sólo sobre un subconjunto de fosfoproteínas, pero presentan una especificidad de sustrato menor que las proteína quinasas.

Algunos enzimas y otras proteínas son regulados mediante la rotura proteolítica de un precursor enzimático

En algunos enzimas, la escisión de un precursor inactivo denominado **zimógeno** da lugar al enzima activo. Muchos enzimas proteolíticos (proteasas) del estómago y del páncreas se regulan de esta manera. La quimotripsina y la tripsina se sintetizan inicialmente en forma de quimotripsinógeno y tripsinógeno, respectivamente **(Fig. 6-39)**. La rotura específica produce cambios de

TABLA 6-10 Secuencias consenso para las proteína quinasas

Proteína quinasa	Secuencias consenso y residuos fosforilados
Proteína quinasa A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Proteína quinasa G	-x-R-[RK]-x-[ST]-X-
Proteína quinasa C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Proteína quinasa B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca2+ /calmodulina quinasa I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca2+ /calmodulina quinasa II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Cadena ligera de la miosina quinasa (músculo liso)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Fosforilasa *b* quinasa	*-K-R-K-Q-I-S-V-R-*
Quinasa extracelular regulada por señal (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Proteína quinasa dependiente de ciclina (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Caseína quinasa I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B[a]
Caseína quinasa II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
Receptor β-adrenérgico quinasa	-[DE](n)-[ST]-x(3)
Rodopsina quinasa	-x(2)-[ST]-E(n)-
Receptor de insulina quinasa	-x-E(3)-Y-M(4)-*K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-*
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) quinasa	*-E(4)-Y-F-E-L-V-*

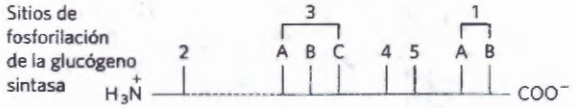
Fuentes: L. A. Pinna and M. H. Ruzzene, Biochim. Biophys. Acta 1314:191, 1996; B. E. Kemp and R. B. Pearson, Trends Biochem. Sci. 15:342, 1990; P. J. Kennelly and E. G. Krebs, J. Biol. Chem. 266:15,555, 1991.

Nota: Se muestran aquí las secuencias consenso deducidas (en tipo redonda) y las secuencias reales de sustratos conocidos (en itálica). Los residuos Ser (S), Thr (T) o Tyr (Y) que se fosforilan están en rojo; todos los residuos aminoácidos se presentan en abreviaturas de una letra (véase la Tabla 3-1). X representa cualquier aminoácido; B, cualquier aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp y Yp residuos de Ser, Thr y Tyr que deben estar ya fosforilados para que la quinasa reconozca el sitio.

[a]El mejor sitio diana tiene dos residuos aminoácidos que separan los residuos diana Ser/Thr fosforilados; los sitios diana con uno o con tres residuos intercalados funcionan a nivel reducido.

conformación que exponen el sitio activo del enzima. Dado que este tipo de activación es irreversible, se necesitan otros mecanismos para inactivar estos enzimas. Las proteasas son inactivadas por proteínas inhibidoras que se fijan muy fuertemente al sitio activo del enzima. Por ejemplo, el inhibidor pancreático de tripsina (M_r 6.000) se fija a la tripsina inhibiéndola; la α_1-antiproteinasa (M_r 53.000) inhibe principalmente la elastasa de neutrófilos (los neutrófilos son un tipo de leucocitos o glóbulos blancos de la sangre; la elastasa es una proteasa que actúa sobre la elastina, componente de algunos tejidos conjuntivos). La insuficiencia de α_1-antiproteinasa, que puede ser debida a la exposición al humo del tabaco, se ha asociado con lesiones pulmonares, entre ellas el enfisema.

Las proteasas no son las únicas proteínas activadas por proteólisis. Sin embargo, en otros casos, los precursores no reciben el nombre de zimógenos sino, más generalmente, **proproteínas** o **proenzimas**. Por ejemplo, el colágeno del tejido conjuntivo se sintetiza inicialmente en forma de un precursor soluble denominado procolágeno.



Quinasa	Sitios de fosforilación	Grado de inactivación de la sintasa
Proteína quinasa A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína quinasa G	1A, 1B, 2	+
Proteína quinasa C	1A	+
Ca^{2+}/calmodulina quinasa	1B, 2	+
Fosforilasa *b* quinasa	2	+
Caseína quinasa I	Al menos nueve	+ + + +
Caseína quinasa II	5	0
Glucógeno sintasa quinasa 3	3A, 3B, 3C	+ + +
Glucógeno sintasa quinasa 4	2	+

FIGURA 6-38 Fosforilaciones reguladoras múltiples. El enzima glucógeno sintasa contiene al menos nueve sitios separados en cinco regiones y que son susceptibles de fosforilación por una de las proteína quinasas celulares. De este modo, la regulación de este enzima no es cuestión de una conmutación (on/off) binaria, sino que resulta de una modulación finamente ajustada de la actividad con un margen de respuesta amplio a una diversidad de señales.

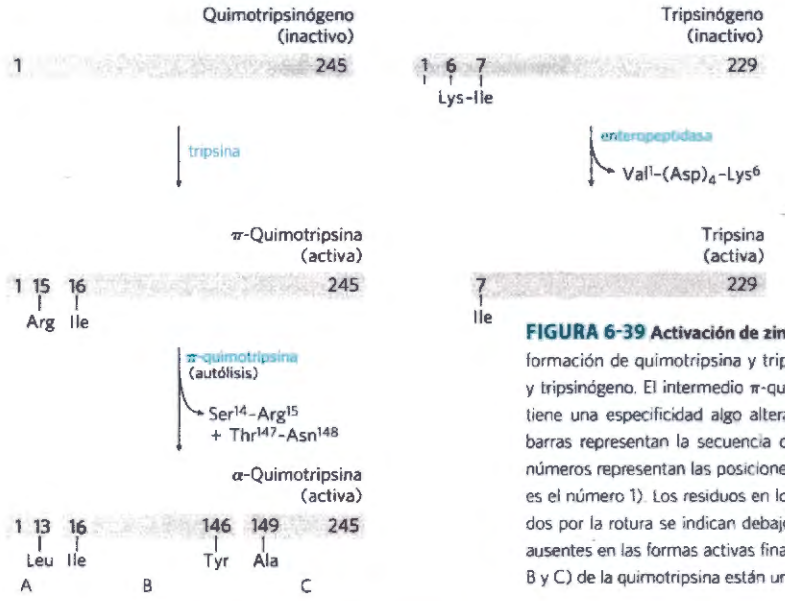


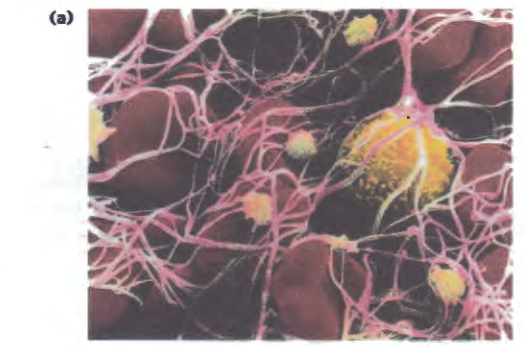
FIGURA 6-39 Activación de zimógenos por rotura proteolítica. Aquí se muestra la formación de quimotripsina y tripsina a partir de sus zimógenos, quimotripsinógeno y tripsinógeno. El intermedio π-quimotripsina generado mediante rotura por la tripsina tiene una especificidad algo alterada con respecto a la α-quimotripsina madura. Las barras representan la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, y los números representan las posiciones relativas de los residuos (el residuo amino-terminal es el número 1). Los residuos en los extremos de los fragmentos polipeptídicos generados por la rotura se indican debajo de las barras. Observe que algunos números están ausentes en las formas activas finales. Recuerde que las tres cadenas polipeptídicas (A, B y C) de la quimotripsina están unidas por puentes disulfuro (véase la Fig. 6-20).

Una cascada de zimógenos activados proteolíticamente conduce a la coagulación de la sangre

Un coágulo sanguíneo es un agregado de fragmentos celulares denominados plaquetas que están entrecruzados y estabilizados por fibras proteicas constituidas principalmente por fibrina **(Fig. 6-40a)**. La fibrina proviene de un zimógeno soluble denominado fibrinógeno. Después de las albúminas y globulinas el fibrinógeno es, en general, el tercer tipo de proteína más abundante del plasma sanguíneo. La formación de un coágulo sanguíneo proporciona un ejemplo bien conocido de una **cascada reguladora**, mecanismo que permite una respuesta muy sensible a una señal molecular, así como su amplificación. Las rutas también ponen en contacto diversos tipos diferentes de regulación.

En una cascada reguladora, una señal lleva a la activación de la proteína X. La proteína X cataliza la activación de la proteína Y. La proteína Y cataliza la activación de la proteína Z y así sucesivamente. Debido a que las proteínas X, Y y Z son catalizadores que activan múltiples copias de la siguiente proteína de la cadena, la señal se amplifica en cada paso. En algunos casos, los pasos de activación implican la rotura proteolítica por lo que, de hecho, son irreversibles. En otros, la activación implica pasos de modificación de la proteína, tales como la fosforilación, la cual es fácilmente reversible. Las cascadas reguladoras gobiernan una amplia gama de procesos biológicos entre los que se incluyen algunos aspectos de la determinación del destino celular durante el desarrollo, la detección de la luz por los bastones de la retina y la muerte celular programada (apoptosis).

El **fibrinógeno** es un dímero de heterotrímeros ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), con tres tipos de subunidades diferentes aunque relacionadas evolutivamente (Fig. 6-40b). El fibrinógeno se convierte en **fibrina**, y de este modo queda activado para coagular la sangre, por la eliminación proteolítica de 16 residuos aminoácidos del extremo amino terminal de cada subunidad α y 14 residuos aminoácidos del extremo amino de cada subunidad β. La eliminación del péptido está catalizada por la serina proteasa **trombina**. Los extremos amino recién expuestos de las subunidades α y β encajan perfectamente en sitios de fijación situados en las porciones globulares carboxi terminales de las subunidades γ y β, respectivamente de otra proteína fibrina. De este modo la fibrina



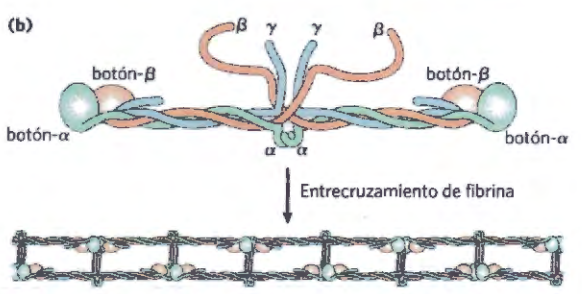


FIGURA 6-40 Función de la fibrina en los coágulos sanguíneos. (a) Un coágulo sanguíneo está formado por plaquetas agregadas (células pequeñas débilmente coloreadas), unidas por cadenas de fibrina entrecruzada. Los eritrocitos (rojos) también están atrapados en la matriz. **(b)** La proteína plasmática soluble fibrinógeno está formado por dos complejos de subunidades α, β, y γ ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). La eliminación de péptidos aminoterminales de las subunidades α y β (no mostrada) conduce a la formación de complejos de orden superior y entrecruzamiento covalente final que da como resultado la formación de fibras de fibrina. Los "botones" son dominios globulares en los extremos de las subunidades proteolizadas. [Fuente: (a) CNRI/Science Source.]

se polimeriza dando una matriz tipo gel que genera un coágulo blando. Las interacciones se estabilizan mediante entrecruzamientos covalentes generados por la condensación de residuos Lys concretos de una subunidad con residuos Gln de la otra, catalizada por una transglutaminasa, el **factor XIIIa**. Los entrecruzamientos covalentes convierten el coágulo blando en un coágulo duro. La activación del fibrinógeno que da fibrina es el pùnto final no de una sino de dos cascadas reguladoras entrelazadas **(Fig. 6-41).** A una de ellas se la conoce como ruta de activación por contacto ("contacto" se refiere a la interacción de componentes clave de este sistema con fosfolípidos aniónicos presentes en la superficie de las plaquetas en el lugar de una herida). Como todos los componentes de esta ruta se encuentran en el plasma sanguíneo, también se conoce como **vía intrínseca**. La segunda ruta es la **vía extrínseca** o del factor tisular. Un componente importante de esta ruta, la proteína **factor tisular (TF)**, no se halla en el torrente circulatorio. La mayor parte de factores proteicos de ambas rutas se designan con números romanos. Muchos de estos factores son serina proteasas del tipo de la quimotripsina, con zimógenos precursores que se sintetizan en el hígado y se exportan a la sangre. Otros factores son proteínas reguladoras que se unen a las serina proteasas colaborando en su activación.

La coagulación sanguínea se inicia con la activación de **plaquetas** circulantes, fragmentos celulares especializados que carecen de núcleo, en el lugar de la herida. Las heridas tisulares producen la exposición a la sangre de moléculas de colágeno presentres debajo de la capa celular epitelial que forra cada vaso sanguíneo. La activación de las plaquetes se desencadena principalmente por interacción con este colágeno. La activación conduce a la exposición de fosfolípidos aniónicos de la superficie de cada plaqueta y a la liberación de moléculas señalizadoras tales como los **tromboxanos** (véase la p. 375) que colaboran en la activación de más plaquetas. Las plaquetas activadas se agregan en el sitio de la herida, formando un coágulo poco firme. La estabilización del coágulo requiere ahora la fibrina generada por las cascadas de la coagulación.

La vía extrínseca actúa en primer lugar. El daño tisular expone el plasma sanguíneo al TF incrustado mayoritariamente en las membranas de los fibroblastos y células del músculo liso por debajo de la capa endotelial. Se forma un complejo iniciador entre el TF y el factor VII, presente en el plasma sanguíneo. El **factor VII** es un zimógeno de una serina proteasa y el TF es una proteína reguladora necesaria para su función. El factor VII se convierte en su forma activa, **factor VIIa**, mediante rotura proteolítica catalizada por el **factor Xa** (otra serina proteasa). El complejo TF-VIIa corta ahora el **factorX**, creando la forma activa, factor Xa.

Si se necesita TF-VIIa para cortar X, y se necesita Xa para cortar TF-VII ¿cómo puede llegar a iniciarse el proceso? En todo momento se halla presente en la sangre una pequeña cantidad de factor VIIa, suficiente para formar una pequeña cantidad del complejo TF-VIIa activo inmediatamente después de haberse dañado el tejido. Esto permite la formación de factor Xa y establece el bucle de inicio retroalimentado. Una vez que empieza a aumentar la concentración de factor Xa, éste (en forma de complejo con la proteína reguladora factor

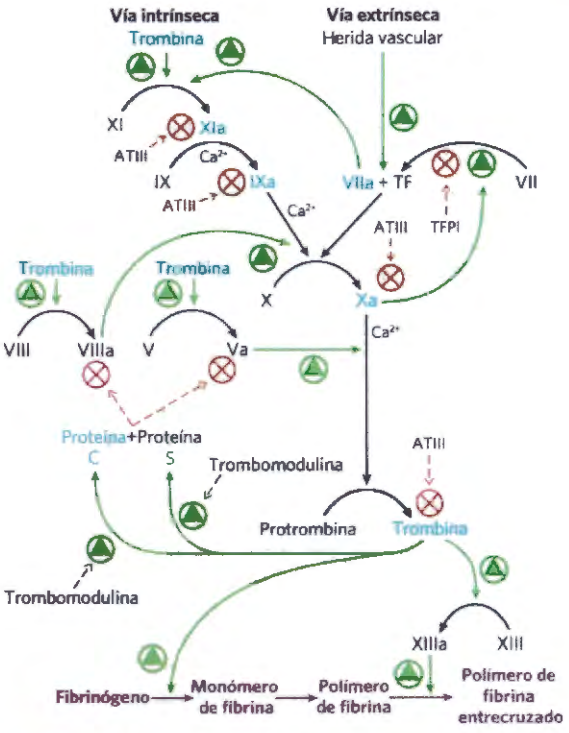


FIGURA 6-41 Cascadas de la coagulación. Se muestran las vías interconectadas intrínseca y extrínseca conducen a la rotura del fibrinógeno para dar fibrina activa. Las serina proteasas activas de las vías se muestran en azul. Las flechas verdes indican pasos de activación y las flechas rojas indican procesos inhibidores.

Va) corta la protrombina dando su forma activa trombina, la cual corta el fibrinógeno.

La vía extrínseca proporciona así una aparición rápida de trombina. No obstante, el complejo TF-VIIa es rápidamente inactivado por la proteína **inhibidor del factor tisular proteico (TFPI)**. La formación del coágulo se mantiene por activación de componentes de la vía intrínseca. El **factor IX** se convierte en la serina proteasa activa **factor IXa** por la proteasa TF-VIIa durante el inicio de la secuencia de coagulación. El factor IXa, en forma de complejo con la proteína **VIIIa**, es relativamente estable y proporciona un enzima alternativo para la conversión proteolítica del factor X a Xa. El IXa activo también puede ser producido por la serina proteasa XIa. La mayor parte de XIa se genera por rotura del zimógeno **factor XI** por la trombina en un bucle de retroalimentación.

Si no se controla, la coagulación de la sangre podría conducir en último término a un bloqueo de los vasos sanguíneos, produciento ataques de corazón o ictus. Por tanto, se necesita más regulación. A medida que se forma un coágulo duro, las rutas reguladoras ya están actuando para limitar el tiempo durante el que es activa la cascada de la coagulación. Además de cortar el fibrinógeno, la trombina también forma un complejo con una proteína incrustada en la superficie vascular de las células endoteliales, la **trombomodulina**. El complejo trombina-trombomodulina corta el zimógeno de la serina proteasa **proteína C**. La proteína C activada, en forma de complejo con la **proteína S** reguladora, corta los factores Va y VIIIa inactivándolos lo que suprime el

conjunto de la cascada. Otra proteína, la **antitrombina III (ATIII)**, es un inhibidor de serina proteasas. La ATIII forma un complejo covalente 1:1 entre un residuo Arg de ATIII y el residuo Ser del sitio activo de serina proteasas, especialmente la trombina y el factor Xa. Estos dos sistemas de regulación, en concierto con TFPI, ayudan a establecer un umbral o nivel de exposición a TF necesario para activar la cascada de coagulación. Los individuos con defectos genéticos que eliminan o disminuyen los niveles de proteína C o de ATIII en la sangre tienen un riesgo muy elevado de trombosis (formación inadecuada de coágulos de sangre).

El control de la coagulación sanguínea es importante en medicina, especialmente en la prevención de la formación de coágulos durante la cirugía y en pacientes con riesgo de ataques de corazón o ictus. Existen varios métodos diferentes para la prevención de la coagulación. El primero aprovecha otra característica de varias proteínas de la cascada de coagulación que aún no hemos mencionado. Los factores, VII, IX, X y la protrombina junto con las proteínas C y S, tienen sitios de fijación de calcio muy importantes para su función. En cada caso los sitios de fijación de calcio están formados por modificación de múltiples residuos Glu, cerca del extremo amino terminal de cada proteína, a residuos **γ-carboxiglutamato** (abreviados **Gla**; véase la p. 81). Las modificaciones Glu a Gla están catalizadas por enzimas que dependen de la función de la vitamina K liposoluble (véase la p. 380). El calcio fijado funciona adheriendo estas proteínas a los fosfolípidos aniónicos que se encuentran en la superficie de las plaquetas activadas, situando de forma efectiva los factores de la coagulación en las áreas en donde se ha de formar el coágulo. Los antagonistas de la vitamina K tales como la **warfarina** (Sintrom) son anticoagulantes de eficiencia probada. Una segunda manera de prevenir la coagulación es la administración de heparinas. Las **heparinas** son polisacáridos muy sulfatados (véase la Fig. 7-22). Actúan como anticoagulantes porque incrementan la afinidad de ATIII hacia el factor Xa y la trombina, facilitando así la inactivación de elementos clave de la cascada véase la Fig. 7-26). Finalmente, la **aspirina** (acetilsalicilato; Fig. 21-15b) es un anticoagulante efectivo. La aspirina inhibe el enzima ciclooxigenasa requerido para la formación de tromboxanos. A medida que la aspirina reduce la liberación de tromboxanos de las plaquetas, disminuye la capacidad de agregación de éstas.

Los humanos nacidos con una deficiencia de un buen número de componentes de la cascada de coagulación muestran una tendencia a sangrar que va de ligera a esencialmente incontrolable, siendo esta última una enfermedad fatal. Defectos genéticos en los genes que codifican proteínas requeridas en la coagulación sanguínea producen enfermedades conocidas como hemofilias. La hemofilia A es una enfermedad ligada al sexo en la que hay una deficiencia de factor VIII. Ésta es la hemofilia humana más frecuente y afecta a unos 5.000 varones en todo el mundo. El ejemplo más famoso de hemofilia A se da entre las familias reales europeas. Evidentemente, la reina Victoria (1919-1901) fue portadora. El príncipe Leopoldo, su octavo hijo, tenía hemofilia A y murió a la edad de 31 después de una pequeña caída. Al menos dos de sus hijas eran portadoras y pasaron el gen defectuoso a otras familias reales de Europa **(Fig. 6-42).**

Algunos enzimas reguladores utilizan varios mecanismos de regulación

La glucógeno fosforilasa cataliza la primera reacción de una ruta que alimenta a partir de glucosa almacenada las rutas del metabolismo de glúcidos que proporcionan energía (Capítulos 14 y 15). Ésta es una ruta metabólica importante y su regulación es en consecuencia compleja. Aunque la regulación primaria de la glucógeno fosforilasa se da a través de una modificación covalente, tal como se describió en la Figura 6-37, la glucógeno fosforilasa está también modulada alostéricamente por AMP, que es un activador de la fosforilasa *b*, y por la glucosa

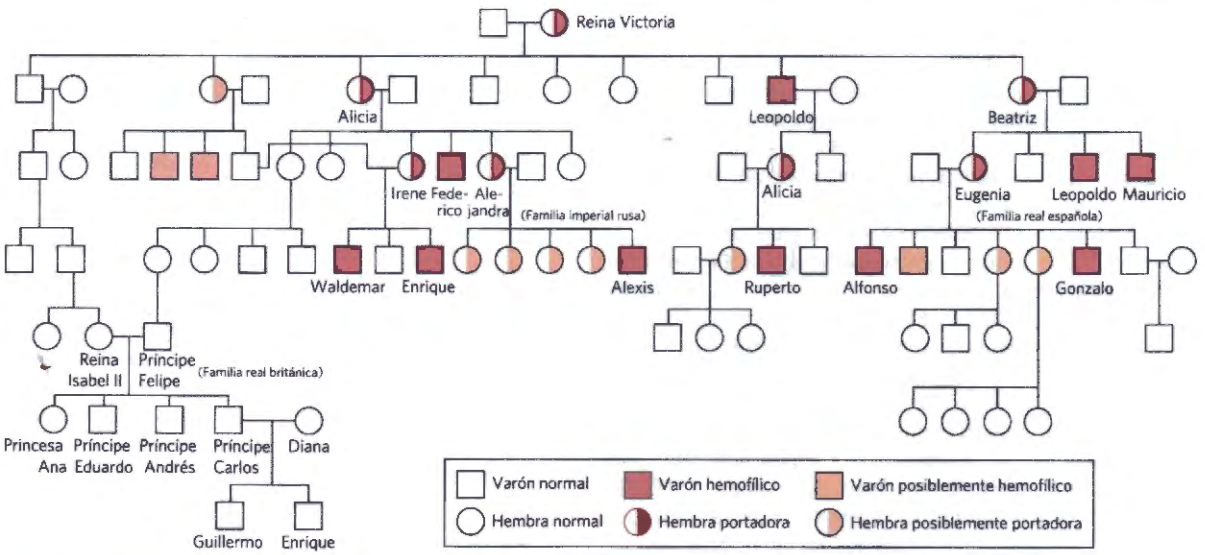


FIGURA 6-42 Familias reales de Europa y herencia de la hemofilia A. Los varones se indican mediante cuadrados y las hembras por círculos. Los varones que padecieron hemofilia están representados por cuadrados rojos mientras que las mujeres presuntamente portadoras por círculos semicoloreados en rojo.

6-fosfato y ATP, ambos inhibidores del enzima. Además, los enzimas que añaden y eliminan grupos fosforilo son a su vez regulados por los niveles de las hormonas que regulan el azúcar en sangre, por lo que el sistema entero es sensible a estas hormonas (**Fig. 6-43**; véanse también los Capítulos 15 y 23).

Se han encontrado otros enzimas reguladores complejos en encrucijadas metabólicas clave. Uno de los enzimas reguladores más complejos conocidos es la glutamina sintetasa bacteriana, que cataliza una reacción que introduce nitrógeno reducido en el metabolismo celular (Capítulo 22). Está regulada alostéricamente (con ocho moduladores alostéricos diferentes, como mínimo); por modificación covalente reversible y mediante la asociación con otras proteínas reguladoras. Este mecanismo se examinará en detalle cuando consideremos la regulación de rutas metabólicas específicas.

¿Cuál es la ventaja de semejante complejidad en la regulación de la actividad enzimática? Hemos empezado este capítulo observando la importancia central de la catálisis en la existencia de la vida. El *control* de la catálisis también es crítico para la vida. Si todas las reacciones posibles en una célula se catalizaran simultáneamente, las macromoléculas y los metabolitos se escindirían rápidamente en formas químicas mucho más simples. Por el contrario, en las células sólo se catalizan las reacciones necesarias en un momento dado. Cuando los recursos químicos son abundantes, se sintetizan y almacenan glucosa y otros metabolitos. Cuando son escasos, las células utilizan estos depósitos para hacer funcionar el metabolismo celular. La energía química se utiliza de forma económica, repartiéndose entre las diversas rutas metabólicas según dicten las necesidades celulares. La disponibilidad de catalizadores poderosos,

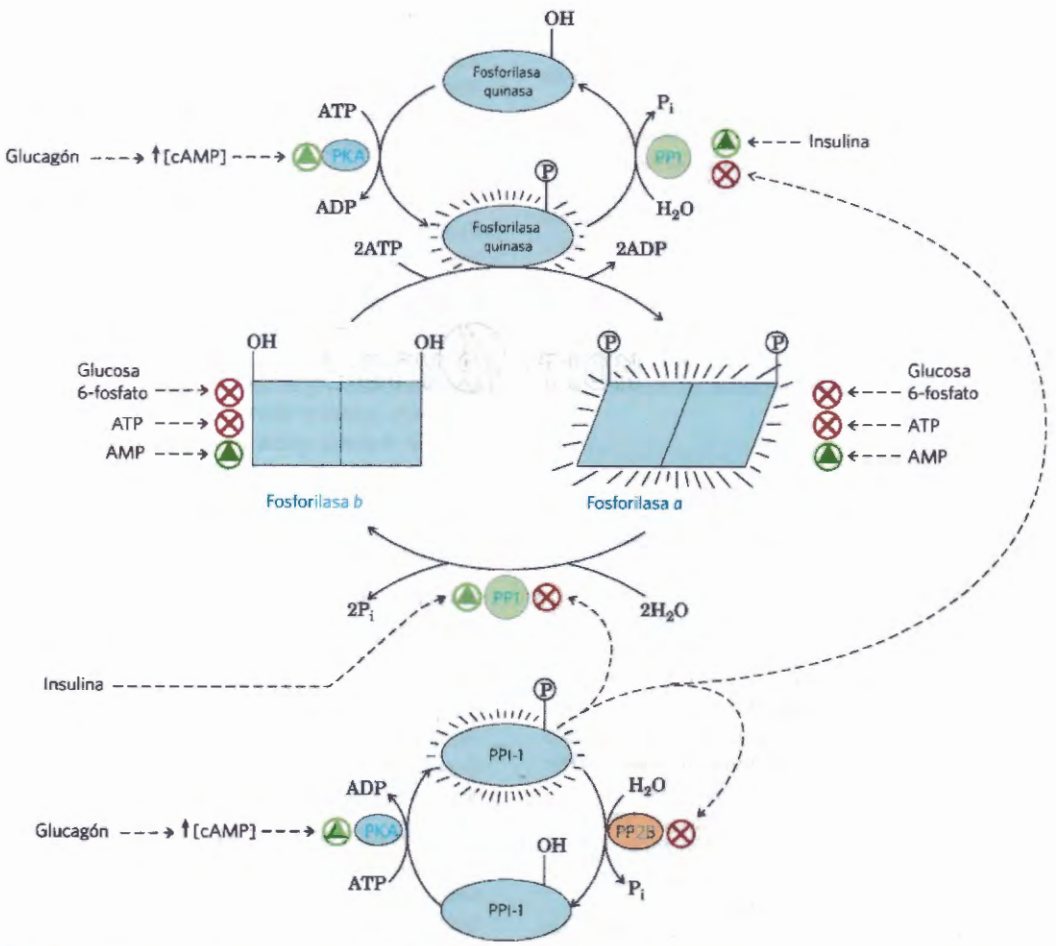


FIGURA 6-43 Regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular mediante fosforilación. La actividad de la glucógeno fosforilasa de músculo está sujeta a un sistema de regulación en múltiples niveles en el que intervienen modificación covalente (fosforilación) mostrada en la Figura 6-36. La regulación alostérica y una cascada reguladora sensible al estatus hormonal que actúa sobre los enzimas implicados en la fosforilación y desfosforilación también tienen papeles importantes. La actividad de ambas formas del enzima está regulada alostéricamente por un activador (AMP) y por inhibidores (glucosa 6-fosfato y ATP) que se unen a sitios distintos del enzima. Las actividades de la fosforilasa quinasa y de la fosforilasa fosfatasa 1 (PPI) también están reguladas por modificación covalente a través de una corta ruta de reacciones que responde a las hormonas glucagón y adrenalina. Una ruta conduce a la fosforilación de la fosforilasa quinasa y el inhibidor 1 de la fosfoproteína fosfatasa 1 (PPI-1). La fosforilasa quinasa fosforilada se activa y a su vez fosforila la glucógeno fosforilasa activándola. Al mismo tiempo, el PPI-1 fosforilado interacciona con la PPI y la inactiva. El PPI-1, por su parte, puede mantenerse también activo (fosforilado) mediante inhibición de la fosfoproteína fosfatasa 2B (PP2B), el enzima que lo desfosforila (inactivándolo). De este modo, el equilibrio entre las formas *a* y *b* de la glucógeno fosforilasa se decanta definitivamente hacia la forma más activa glucógeno fosforilasa *a*. Observe que ambas formas de fosforilasa quinasa se activan hasta cierto punto por acción del ión Ca^{2+} (no mostrado). Esta ruta se discute con mayor detalle en los Capítulos 14, 15 y 23.

cada uno específico para una reacción determinada, hace posible la regulación de estas reacciones. Éstas, a su vez, originan la compleja y altamente regulada sinfonía que denominamos vida.

RESUMEN 6.5 Enzimas reguladores

- La actividad de las rutas metabólicas en las células está regulada mediante el control de las actividades de ciertos enzimas.
- La actividad de los enzimas alostéricos se ajusta mediante unión reversible de un modulador específico a un sitio regulador. Los moduladores pueden ser el propio sustrato o algún otro metabolito, y el efecto del modulador puede ser activador o inhibidor. El comportamiento cinético de los enzimas alostéricos es un reflejo de las interacciones cooperativas entre subunidades del enzima.
- Otros enzimas reguladores son modulados mediante modificación covalente de un grupo funcional específico necesario para la actividad. La fosforilación de residuos aminoácidos específicos es un método muy común de regulación de la actividad enzimática.
- Muchos enzimas proteolíticos se sintetizan como precursores inactivos denominados zimógenos, que se activan por rotura de fragmentos peptídicos pequeños.
- La coagulación de la sangre se produce mediante dos cascadas reguladoras interconectadas de zimógenos activados proteolíticamente.
- Los enzimas que actúan en importantes intersecciones metabólicas pueden estar regulados a través de complejas combinaciones de efectores, lo que permite la coordinación de las actividades en rutas interconectadas.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

enzima 190
cofactor 190
coenzima 190
grupo prostético 190
holoenzima 190
apoenzima 190
apoproteína 190
sitio activo 192
sustrato 192
estado basal 192
estado de transición 193
energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) 193
intermedio de reacción 193
paso limitante de velocidad 193
constante de equilibrio (K_{eq}) 194
constante de velocidad 194
energía de fijación (ΔG_B) 195
especificidad 197
encaje inducido 198
catálisis ácido-base específica 199
catálisis ácido-base general 199
catálisis covalente 200
cinética enzimática 200
velocidad inicial (V_0) 200
V_{max} 201
estado pre-estacionario 202
estado estacionario 202
cinética del estado estacionario 202
hipótesis del estado estacionario 202
constante de Michaelis (K_m) 203
ecuación de Michaelis-Menten 203
ecuación de Lineweaver-Burk 204
constante de disociación (K_d) 204
k_{cat} 205
número de recambio 205
Notación de Cleland 207
inhibición reversible 210
inhibición competitiva 210
inhibidor acompetitivo 210
inhibición mixta 211
inhibición no competitiva 212
inhibidores irreversibles 212
inactivador suicida 212
análogos del estado de transición 214
serina proteasas 217
enzima regulador 227
enzima alostérico 228
modulador alostérico (efector alostérico) 228
proteína quinasas 231
proteína fosfatasas 231
zimógeno 232
proproteínas (proenzimas) 234
cascada reguladora 234
fibrinógeno 234
trombina 234
fibrina 234
vía intrínseca 235
vía extrínseca 235

Problemas

1. Mantenimiento del sabor dulce del maíz El sabor dulce del maíz recién cosechado es debido a la gran cantidad de azúcar de los granos. El maíz comprado en la tienda (varios días después de la cosecha) no es tan dulce debido a que el 50% del azúcar libre del maíz se convierte en almidón durante el primer día después de la cosecha. Para mantener el sabor dulce del maíz fresco, se sumergen las espigas en agua hirviente durante unos minutos (se escaldan) enfriándose después en agua fría. El maíz procesado de esta manera y mantenido en un congelador mantiene su dulzor ¿Cuál es la base bioquímica de este proceso?

2. Concentración intracelular de enzimas Para calcular aproximadamente la concentración real de enzimas en una célula bacteriana, suponga que la célula contiene 1.000 enzimas diferentes a igual concentración disueltos en el citosol, y que cada proteína tiene una masa molecular relativa de 100.000. Suponga que la célula bacteriana es un cilindro (diámetro 1,0 μm, altura 2,0 μm). Si el citosol (densidad 1,20) contiene un 20% de proteína soluble en peso y si la proteína soluble consiste únicamente en enzimas, calcule la concentración molar *media* de cada enzima en esta célula hipotética.

3. Incremento de velocidad por la ureasa El enzima ureasa aumenta la velocidad de hidrólisis de la urea a pH 8,0 y 20 °C en un factor de 10^{14}. Si una cantidad dada de ureasa puede hidrolizar completamente una cantidad determinada de urea en 5 min a 20 °C y pH 8,0, ¿cuánto tardará en hidrolizarse esta cantidad de urea en las mismas condiciones pero en ausencia de ureasa? Suponga que ambas reacciones tienen lugar en sistemas estériles de modo que las bacterias no pueden atacar la urea.

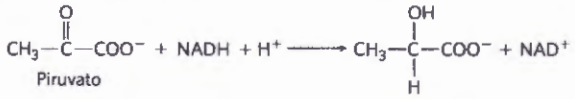
4. Protección de un enzima contra la desnaturalización por calor Cuando se calientan soluciones de enzima, se produce una pérdida progresiva de la actividad con el tiempo debida a la desnaturalización del enzima. Una solución del enzima hexoquinasa incubada a 45 °C perdió el 50% de su actividad en 12 min, pero cuando se incubó la hexoquinasa a 45 °C en presencia de una gran concentración de uno de sus sustratos, sólo perdió el 3% de su actividad. Sugiera por qué la desnaturalización térmica de la hexoquinasa se retardó en presencia de uno de sus sustratos.

5. Requerimientos del sitio activo de los enzimas La carboxipeptidasa, que elimina secuencialmente los residuos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de sus sustratos peptídicos, está formada por una cadena sencilla de 307 aminoácidos. Los dos grupos catalíticos esenciales del sitio activo son proporcionados por Arg^{145} y Glu^{270}.

(a) Si la cadena de carboxipeptidasa fuese una hélice α perfecta, ¿qué distancia existiría (en nanómetros) entre Arg^{145} y Glu^{270}? (Pista: Vea la Fig. 4-4a.)

(b) Explique por qué estos dos residuos aminoácidos tan lejanos en la secuencia, pueden catalizar una reacción que tiene lugar en un espacio de unas décimas de nanómetro.

6.Determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa El enzima muscular lactato deshidrogenasa cataliza la reacción



NADH y NAD^+ son las formas reducida y oxidada, respectivamente, del coenzima NAD. Las soluciones de NADH, pero *no* las de NAD^+, absorben luz a 340 nm. Esta propiedad se utiliza para determinar la concentración de NADH en disolución midiendo espectrofotométricamente la cantidad de luz absorbida por la solución a 340 nm. Explique cómo se pueden utilizar estas propiedades del NADH para diseñar una determinación cuantitativa de la actividad de la lactato deshidrogenasa.

7. Efecto de los enzimas sobre las reacciones ¿Cuál de los efectos indicados sería provocado por un enzima que catalizara la reacción simple

$$S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P \qquad \text{donde} \qquad K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

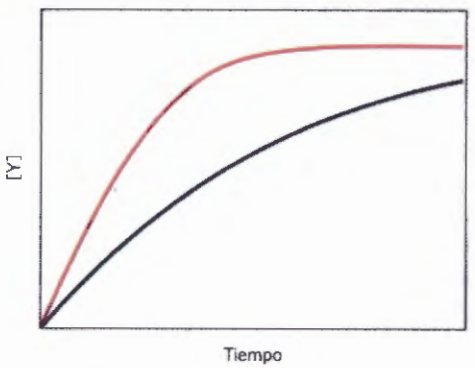
Descenso de K'_{eq}; (b) aumento de k_1; (c) aumento de K'_{eq}; (d) aumento de $\Delta G^{\ddagger}$; (e) descenso de $\Delta G^{\ddagger}$; (f) $\Delta G'^{o}$ más negativa; (g) aumento de k_2.

8. Relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato: Ecuación de Michaelis-Menten

(a) ¿A qué concentración de sustrato mostrará un enzima cuya k_{cat} es 30,0 s-1 y su K_m 0,0050 M una cuarta parte de su velocidad máxima?

(b) Determine la fracción de V_{max} que se encontrará a las siguientes concentraciones de sustrato [S]: $\frac{1}{2} K_m$, $2 K_m$ y $10 K_m$.

(c) Se aísla un enzima que cataliza la reacción X D Y a partir de dos especies bacterianas. Los enzimas tienen la misma V_{max} pero diferentes valores de K_m para el sustrato X. El enzima A tiene una K_m de 2,0 μM, mientras que el enzima B tiene una K_m de 0,5 μM, La gráfica inferior muestra la cinética de las reacciones llevadas a cabo con la misma concentración de cada enzima y con [X] = 1 μM, ¿Qué curva corresponde a cada enzima?



9. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten I. Un enzima cataliza la reacción A D B. El enzima se halla a una concentración de 2 nM y la V_{max} es 1,2 μM s^{-1}. La K_m del sustrato A es 10μM. Calcule la velocidad inicial de la reacción, V_0, cuando la concentración de sustrato es (a) 2 μM, (b) 10 μM y (c) 30μM.

10. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten II. Un enzima cataliza la reacción M D N. El enzima está presente a una concentración de 1 nM y la *V*max es 2 μMs^{-1}. La K_m para el sustrato M es 4 μM. (a) Calcule *k*cat. (b)¿Qué valores de V_{max} y K_m deberían observarse en presencia de cantidades suficientes de un inhibidor acompetitivo para generar un α' de 2,0?

11. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten III Un grupo de investigación descubre una nueva versión de la felicidasa, a la que denominan felicidasa*, que cataliza la reacción química FELIZ ⇋ TRISTE.

Los investigadores empiezan a caracterizar el enzima.

En el primer experimento, con una $[E_t]$ de 4 nM, encuentran que la V_{max} es de 1,6 μM s^{-1}. En base a este experimento, ¿Cuál es la k_{cat} de la felicidasa*? (Incluya las unidades adecuadas.)

En otro experimento, con una $[E_t]$ de 1 nM y una [FELIZ] de 30 μM, los investigadores encuentran que V_0 = 300 nM s^{-1}. ¿Cuál es la K_m de la felicidasa* para el sustrato FELIZ? (Incluya las unidades adecuadas.)

Investigaciones posteriores indican que el enzima felicidasa* purificado y usado en los dos experimentos anteriores estaba contaminado con un inhibidor reversible llamado IRA. Cuando IRA se eliminaba con cuidado de la preparación de felicidasa* y se repetían los dos experimentos, la V_{max} medida en (a) aumentaba hasta 4,8 μM s^{-1}, y la K_m medida en (b) pasaba a ser de 15 μM. Calcular los valores α y α' para el inhibidor IRA.

En base a la información anterior, ¿Qué tipo de inhibidor es IRA?

12. Aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten IV Se encuentra un enzima que cataliza la reacción

X ⇋ Y.

Los investigadores encuentran que la K_m para el sustrato A es 4 μM, y que la k_{cat} es 20 min^{-1}.

En uno de los experimentos, [X] = 6 mM y V_0 = 480 nM min^{-1}. ¿Cuál era la $[E_t]$ usada en el experimento?

En otro experimento, $[E_t]$ = 0,5 μM, y la V_0 = 5 μM min^{-1}. ¿Cuál era la [X] usada en el experimento?

Se observó que el compuesto Z es un inhibidor competitivo muy fuerte del enzima, con una α de 10. En un experimento con la misma $[E_t]$ que en (a), pero con diferente [X], se añade una cantidad de Z que reduce V_0 a 240 nM min^{-1}. ¿Cuál es la [X] usada en este experimento?

En base a los parámetros cinéticos anteriores, ¿se puede decir que este enzima ha evolucionado hasta la perfección catalítica? Explique su razonamiento brevemente, usando el parámetro o los parámetros cinéticos que definen la perfección catalítica.

13. Cálculo de V_{max} y K_m por observación Aunque existen métodos gráficos para la determinación precisa de V_{max} y K_m de una reacción catalizada enzimáticamente (véase el Recuadro 6-1), a veces es posible calcular rápidamente estos valores mediante inspección de los valores de V_0 a [S] crecientes. Calcule el valor de V_{max} y K_m de la reacción catalizada enzimáticamente para la que se obtuvieron los datos siguientes:

[S](M)	V_0 (μM/min)
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-6}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

14. Propiedades de un enzima de la síntesis de prostaglandinas Las prostaglandinas son un tipo de icosanoides, derivados de ácidos grasos con una variedad de efectos extremadamente potentes en los tejidos de los vertebrados. Las prostaglandinas son las responsables de la producción de fiebre e inflamación y su dolor asociado. Provienen del ácido araquidónico, ácido graso de 20 carbonos en una reacción catalizada por el enzima prostaglandina endoperóxido sintasa. Este enzima, una cicloxigenasa, utiliza oxígeno para convertir el ácido araquidónico en PGG_2, precursor inmediato de muchas prostaglandinas diferentes (la síntesis de prostaglandinas se describe en el Capítulo 21).

(a) Los siguientes datos cinéticos son para la reacción catalizada por la prostaglandina endoperóxido sintasa. Prestando atención a las dos primeras columnas, determine la V_{max} y K_m del enzima.

[ácido araquidónico] (mM)	Velocidad de formación de PGG_2 (mM/min^{-1})	Velocidad de formación de PGG_2 con 10mg/mL de ibuprofeno (mM/min^{-1})
0,6	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

(b) El ibuprofeno es un inhibidor de la prostaglandina endoperóxido sintasa. El ibuprofeno reduce la inflamación y el dolor mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Utilizando los datos de la primera y la tercera columna de la tabla, determine el tipo de inhibición que el ibuprofeno ejerce sobre la prostaglandina endoperóxido sintasa.

15. Análisis gráfico de V_{max} y K_m Los siguientes datos experimentales se recogieron durante un estudio de la actividad catalítica de una peptidasa intestinal con el sustrato glicilglicina:

$$\text{Glicilglicina} + H_2O \rightarrow 2\ \text{glicina}$$

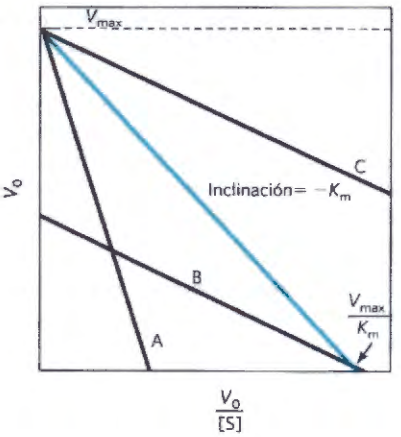
[S](mM)	Producto formado (μmol/min^{-1})
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

A partir de estos datos, determine por análisis gráfico (véase el Recuadro 6-1 y su gráfico dinámico asociado) los valores de V_{max} y K_m para esta preparación enzimática y su sustrato.

16. Ecuación de Eadie-Hofstee. Existen varias formas de transformar la ecuación de Michaelis-Menten para representar los datos y obtener los parámetros cinéticos, cada una con diferentes ventajas según el conjunto de datos que se analiza. La ecuación de Lineweaver-Burk, o de los dobles recíprocos, es una transformación de la ecuación de Michaelis-Menten. Multiplicando ambos miembros de la ecuación de Lineweaver-Burk por V_{max} y reordenando, se obtiene la ecuación de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m)\frac{V_0}{[S]} + V_{max}$$

En la gráfica siguiente se muestra una representación de V_0 frente a $V_0/[S]$ para una reacción catalizada por un enzima. La curva azul se obtuvo en ausencia de inhibidor. ¿Cuál de las otras curvas (A, B, o C) muestra la actividad enzimática obtenida cuando se añade un inhibidor competitivo a la mezcla de reacción? Pista: Véase la ecuación 6-30.



17. Número de recambio de la carbónico anhidrasa La carbónico anhidrasa de los eritrocitos (M_r 30.000) tiene uno de los números de recambio conocidos más elevado. Cataliza la hidratación reversible del CO_2:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Éste es un importante proceso en el transporte de CO_2 desde los tejidos a los pulmones. Si 10,0 μg de carbónico anhidrasa pura catalizan la hidratación de 0,30 g de CO2 en 1 min a 37 °C y a V_{max}, ¿cuál es el número de recambio (k_{cat}) de la carbónico anhidrasa (en unidades de min^{-1})?

18. Deducción de la ecuación de velocidad de un inhibidor competitivo La ecuación de velocidad de un enzima sujeto a inhibición competitiva es

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Empezando con una definición nueva del enzima total como

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

y las definiciones de α y K_i que se proporcionan en el texto, obtenga la ecuación anterior. Utilize como guía la deducción de la ecuación de Michaelis-Menten.

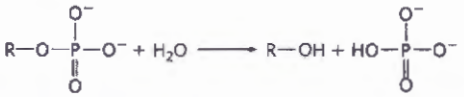
19. Inhibición irreversible de un enzima Muchos enzimas son inhibidos de manera irreversible por iones de metales pesados tales como Hg^{2+}, Cu^{2+} o Ag^+, que pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo esenciales formando mercapturos:

$$\text{Enz-SH} + Ag^+ \longrightarrow \text{Enz–S–Ag} + H^+$$

La afinidad de Ag^+ por los grupos sulfhidrilo es tan grande que se puede utilizar para valorar grupos —SH de manera

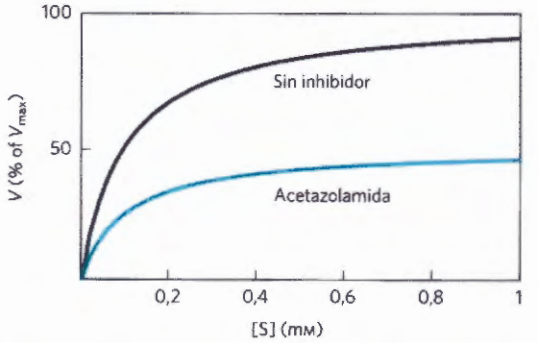
cuantitativa. A 10,0 mL de una solución que contiene 1,0 mg/mL de un enzima puro, un investigador le añade una cantidad suficiente de AgNO3 para inactivar completamente el enzima. Hace falta un total de 0,342 μmol de AgNO3. Calcule la masa molecular mínima del enzima. ¿Por qué el valor obtenido de esta forma sólo da la masa molecular *mínima*?

20. Aplicación clínica de la inhibición enzimática diferencial El suero sanguíneo humano contiene una clase de enzimas denominados fosfatasas ácidas que hidrolizan ésteres fosfato biológicos en condiciones ligeramente ácidas (pH 5,0):



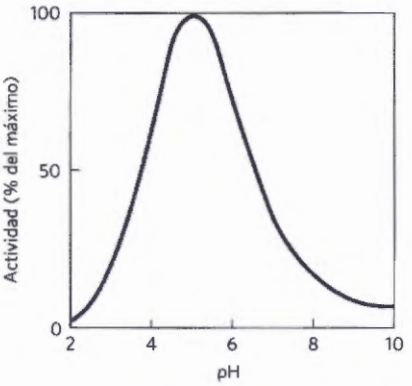
Las fosfatasas ácidas son producidas por los eritrocitos, el hígado, bazo, riñón y glándula prostática. El enzima de la glándula prostática es importante en clínica porque un incremento de su actividad en la sangre puede ser un indicador de cáncer de próstata. La fosfatasa de la próstata es fuertemente inhibida por el ion tartrato mientras que las fosfatasas ácidas de los otros tejidos son insensibles al mismo. ¿Cómo se puede utilizar esta información para desarrollar un procedimiento específico para medir la actividad fosfatasa ácida de la glándula prostática en el suero sanguíneo humano?

21. Inhibición de la carbónico anhidrasa por la acetazolamida La carbónico anhidrasa es fuertemente inhibida por el fármaco acetazolamida que se utiliza como diurético (incrementa la producción de orina) y para reducir la presión intraocular excesivamente elevada del glaucoma (producida por acumulación de líquido intraocular). La carbónico anhidrasa juega un papel importante en estos y en otros procesos secretores debido a que participa en la regulación del pH y del contenido de bicarbonato en una serie de fluidos corporales. La curva experimental de la velocidad de reacción inicial (dada aquí en forma de porcentaje de V_{max}) frente a [S] para la reacción de la carbónico anhidrasa se ilustra en la figura (curva superior). Cuando se repite el experimento en presencia de acetazolamida se obtiene la curva inferior. A partir de la inspección de las curvas y de sus conocimientos de las propiedades cinéticas de los inhibidores enzimáticos competitivos y mixtos, determine la naturaleza de la inhibición por la acetazolamida. Explíquelo.



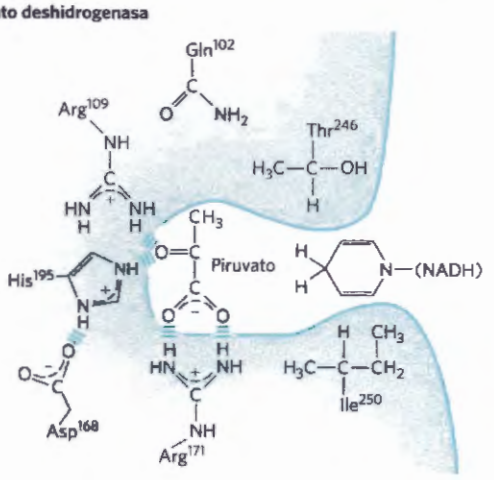
22. Efectos de los inhibidores reversibles Obtenga la expresión que describe el efecto de un inhibidor reversible sobre la K_m observada (K_m aparente = $\alpha K_m/\alpha'$). Empiece con la Ecuación 6-30 y con la definición de K_m como la [S] a la que $V_0 = V_{max}/2\alpha'$.

23. pH óptimo de la lisozima El sitio activo de la lisozima contiene dos residuos aminoácidos esenciales para la catálisis: Glu^{35} y Asp^{52}. Los valores de pK_a de los carboxilos de las cadenas laterales de estos residuos son 5,9 y 4,5, respectivamente. ¿Cuál es el estado de ionización (protonado o desprotonado) de cada residuo a pH 5,2, el pH óptimo de la lisozima? ¿De qué modo el estado de ionización de estos dos residuos aminoácidos puede explicar el perfil de actividad frente al pH de la lisozima que se muestra en la figura?



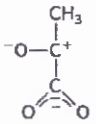
Problema de análisis de datos

24. Exploración e ingeniería de la lactato deshidrogenasa El examen de la estructura de un enzima genera hipótesis sobre la relación entre diferentes aminoácidos de la estructura y la función de la proteína. Una manera de probar estas hipótesis consiste en el uso de la tecnología del DNA recombinante para generar versiones mutadas del enzima y poder examinar la estructura y la función de estas formas alteradas. La tecnología usada se describe en el Capítulo 9.
Un ejemplo de este tipo de análisis es el trabajo de A.R. Clarke y colaboradores sobre el enzima lactato deshidrogenasa, publicado en 1989. La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato con el NADH para formar lactato (véase la Sección 14.3). A continuación se muestra un esquema del sitio activo del enzima; el piruvato está en el centro:



El mecanismo de reacción es similar al de muchas reducciones a cargo del NADH (véase la Fig. 13-24); es aproximadamente el inverso de los pasos ❷ y ❸ de la Figura 14-8. El estado de transición implica la intervención de un grupo car-

bonilo fuertemente polarizado en la molécula de piruvato, tal como se muestra debajo:



Una forma mutante de la LDH en la que Arg^{109} es reemplazada por Gln muestra sólo un 5% de la capacidad de unión a piruvato y un 0,07% de la actividad del enzima salvaje. Proponga una explicación plausible para los efectos de esta mutación.

Una forma mutante de la LDH en la que Arg^{171} es reemplazada por Lys muestra sólo un 0,05% de la capacidad de unión a sustrato de la proteína original. ¿Por qué es sorprendente este efecto tan grande?

En la estructura cristalina de la LDH, el grupo guanidinio de la Arg^{171} y el grupo carboxilo del piruvato están alineados en una configuración co-planar en "horquilla". En base a esta observación, proponga una explicación plausible para el enorme efecto producido por la sustitución de Arg^{171} por Lys.

Una forma mutante de la LDH en la que Ile^{250} es reemplazada por Gln reduce la capacidad de unión de NADH. Proponga una explicación plausible para este resultado.

Clarke y sus colegas también se propusieron obtener una versión mutante de LDH que uniera oxalacetato en lugar de piruvato. Llevaron a cabo una única sustitución, reemplazando Gln^{102} por Arg; El enzima resultante reducía el oxalacetato a malato y no lo hacía con el piruvato para pasar a lactato. Habían convertido, por tanto, LDH en malato deshidrogenasa.

Dibuje el sitio activo de esta LDH mutante con el oxalacetato unido.

¿Por qué este enzima mutante utiliza ahora el oxalacetato como sustrato en lugar del piruvato?

Los autores se sorprendieron de que la sustitución con un aminoácido más grande en el sitio activo permitiera la unión de un sustrato también mayor. Explique este resultado.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 7

Glúcidos y glucobiología

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e..

7.1 Monosacáridos y disacáridos 243

7.2 Polisacáridos 254

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucoesfingolípidos 263

7.4 Los glúcidos son moléculas que contienen información: El código de los azúcares 269

7.5 Trabajando con glúcidos 274

Los glúcidos son las biomoléculas más abundantes de la tierra. Cada año, la fotosíntesis convierte más de 100.000 millones de toneladas métricas de CO_2 y H_2O en celulosa y otros productos vegetales. Ciertos glúcidos (como el azúcar y el almidón) son fundamentales en la dieta humana en la mayor parte del mundo, y la oxidación de glúcidos es la principal ruta de obtención de energía en la mayoría de las células no fotosintéticas. Los polímeros de los glúcidos (también llamados glucanos) actúan como elementos estructurales y de protección en las paredes celulares de las bacterias y las plantas y en los tejidos conjuntivos de los animales. Otros polímeros de glúcidos lubrican las articulaciones óseas y participan en el reconocimiento y la adhesión intercelular. Los polímeros complejos de glúcidos, unidos covalentemente a proteínas o lípidos, actúan de señal de localización intracelular o de destino metabólico de estas moléculas híbridas denominadas **glucoconjugados**. En este capítulo se introducen las principales clases de glúcidos y glucoconjugados y se dan algunos ejemplos de los muchos papeles estructurales y funcionales que desempeñan.

Los **glúcidos** son polihidroxialdehídos o cetonas, o bien, sustancias cuya hidrólisis da lugar a estos compuestos. Muchos glúcidos, aunque no todos, poseen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$; algunos glúcidos también contienen nitrógeno, fósforo o azufre. Existen tres clases principales de glúcidos según su tamaño: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (la palabra "sacárido" viene del griego *sakcharon*, que significa "azúcar"). Los **monosacáridos**, o azúcares simples, consisten en una sola unidad de polihidroxialdehído o cetona. El monosacárido más abundante en la naturaleza es la D-glucosa de seis átomos de carbono, a veces llamada dextrosa. Los monosacáridos de más de cuatro átomos de carbono suelen poseer estructuras cíclicas.

Los **oligosacáridos** consisten en cadenas cortas de unidades de monosacárido, o residuos, unidas por enlaces glucosídicos característicos. Los más abundantes son los **disacáridos**, formados por dos unidades de monosacárido. El más conocido es la sacarosa, o azúcar de caña, formado por los azúcares de seis carbonos D-glucosa y D-fructosa. Todos los monosacáridos y disacáridos comunes tienen nombres que terminan con el sufijo "-osa". La mayor parte de oligosacáridos con tres o más unidades de monosacárido no se encuentran libres en la célula sino unidos a otro tipo de moléculas (lípidos o proteínas) formando glucoconjugados.

Los **polisacáridos** son polímeros que contienen más de 20 unidades de monosacárido; algunos polisacáridos constan de centenares o millares de unidades de monosacárido. Algunos polisacáridos, como por ejemplo la celulosa, son cadenas lineales; otros, tales como el glucógeno, están ramificados. Tanto el glucógeno como la celulosa consisten en unidades repetitivas de D-glucosa, pero difieren en el tipo de enlace glucosídico y, en consecuencia, tienen propiedades y funciones biológicas notablemente diferentes.

7.1 Monosacáridos y disacáridos

Los glúcidos más simples, los monosacáridos, son aldehídos o cetonas, con dos o más grupos hidroxilo; los monosacáridos de seis carbonos glucosa y fructosa tienen cinco grupos hidroxilo. Una gran parte de los átomos de carbono a los que se unen los grupos hidroxilo son centros quirales que dan lugar a los muchos estereoisómeros de los azúcares que se encuentran en la naturaleza. La estereoisomería de los azúcares es biológicamente significativa porque los enzimas que actúan sobre los azúcares son estrictamente estereoespecífi-

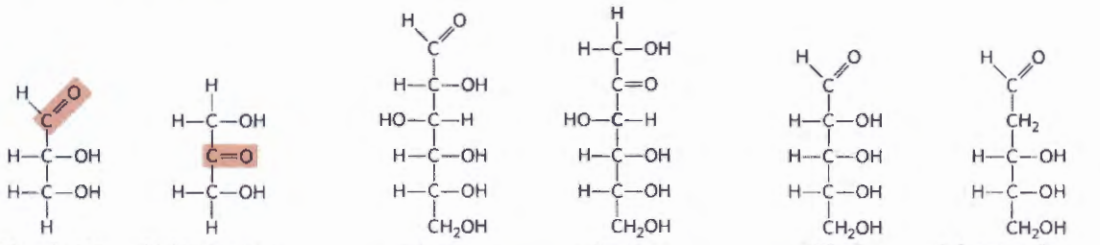


FIGURA 7-1 Monosacáridos representativos. **(a)** Dos triosas, una aldosa y una cetosa. El grupo carbonilo de cada una está sombreado. **(b)** Dos hexosas comunes. **(c)** Las pentosas que forman parte de los ácidos nucleicos. La D-ribosa es un componente del ácido ribonucleico (RNA) y la 2-desoxi-D-ribosa es un componente del ácido desoxirribonucleico (DNA).

cos, prefiriendo normalmente un estereoisómero al otro en tres o más órdenes de magnitud, tal como se refleja en los valores de K_m o de las constantes de fijación. Es tan difícil encajar un estereoisómero incorrecto del azúcar en el sitio de unión del enzima como poner su guante izquierdo en su mano derecha.

Empezaremos describiendo las familias de monosacáridos que tienen entre tres y siete átomos de carbono: su estructura y formas estereoisoméricas y cómo se representan sobre el papel sus estructuras tridimensionales. A continuación, discutiremos algunas reacciones químicas de los grupos carbonilo de los monosacáridos. Una de estas reacciones, la adición de un grupo hidroxilo dentro de la misma molécula, genera las formas cíclicas con un esqueleto de cuatro o más carbonos (que predominan en disolución acuosa) y da lugar a la aparición de un nuevo centro quiral, que incrementa la complejidad estereoquímica de estos compuestos. Por tanto, se describirá con cierto detalle la nomenclatura usada para especificar sin ambigüedad la configuración adoptada alrededor de cada átomo de carbono en la forma cíclica y la manera de representar estas estructuras sobre el papel; esta información será de utilidad para la discusión del metabolismo de los monosacáridos en la Parte II. También presentamos aquí algunos derivados importantes de los monosacáridos que encontraremos en capítulos posteriores.

Las dos familias de monosacáridos son las aldosas y las cetosas

Los monosacáridos son sólidos incoloros y cristalinos, solubles en agua e insolubles en disolventes no polares. La mayoría tienen sabor dulce (véase el Recuadro 7-2, p. 252). El esqueleto de los monosacáridos comunes consiste en una cadena de carbonos sin ramificar en la que todos los átomos de carbono están unidos por enlaces sencillos. En las formas de cadena abierta, uno de los átomos de carbono está unido a un átomo de oxígeno por un doble enlace, formando un grupo carbonilo; cada uno de los demás átomos de carbono tiene un grupo hidroxilo. Si el grupo carbonilo se halla en un extremo de la cadena carbonada, (es decir, en un grupo aldehído) el monosacárido recibe el nombre de **aldosa**; si el grupo carbonilo se encuentra en cualquier otra posición, (en un grupo cetona) el monosacárido se denomina **cetosa**. Los monosacáridos más sencillos son las dos triosas de tres átomos de carbono: el gliceraldehído, una aldotriosa, y la dihidroxiacetona, una cetosa **(Fig. 7-1a)**.

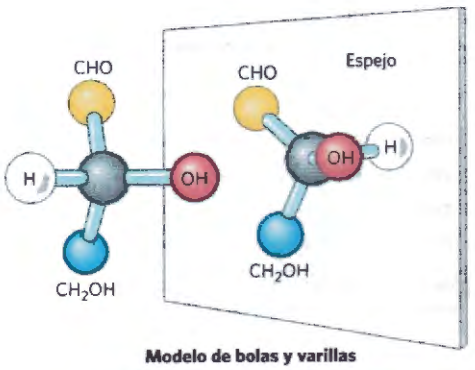
Los monosacáridos que poseen cuatro, cinco, seis y siete átomos de carbono en su cadena carbonada se denominan, respectivamente, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas. Existen aldosas y cetosas para cada una de estas longitudes de cadena: aldotetrosas y cetotetrosas, aldopentosas y cetopentosas, y así sucesivamente. Las hexosas, entre las que se cuentan la aldohexosa D-glucosa y la cetohexosa D-fructosa (Fig. 7-1b) son los monosacáridos más comunes en la naturaleza (son los productos de la fotosíntesis e intermedios clave en la secuencia de reacciones clave que produce energía en la mayoría de organismos). Las aldopentosas D-ribosa y 2-desoxi-D-ribosa (Fig. 7-1c) son componentes de los nucleótidos y los ácidos nucleicos (Capítulo 8).

Los monosacáridos tienen centros asimétricos

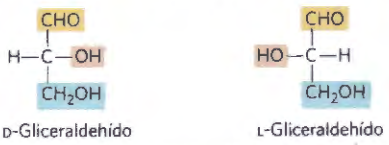
Todos los monosacáridos excepto la dihidroxiacetona contienen uno o más átomos de carbono asimétricos (quirales) y, por lo tanto, se encuentran en formas isoméricas ópticamente activas (pp. 17-18). La aldosa más sencilla, el gliceraldehído, contiene un centro quiral (el átomo de carbono central) y tiene, por tanto, dos isómeros ópticos, o **enantiómeros**, diferentes **(Fig. 7-2)**.

›› Convención Clave: Por convención, uno de los dos enantiómeros del gliceraldehído se denomina isómero D, y el otro isómero L. Como ocurre con otras biomoléculas con centros quirales, la configuración absoluta de los azúcares se ha determinado por cristalografía de rayos X. Para representar sobre el papel la estructura tridimensional de los azúcares se suelen emplear las **fórmulas de proyección de Fischer** (Fig. 7-2). En estas proyecciones, los enlaces horizontales se proyectan fuera del plano del papel hacia el lector; los enlaces verticales se proyectan por detrás del plano del papel alejándose del lector. **‹‹**

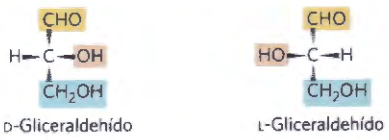
En general, una molécula con n centros quirales puede tener 2^n estereoisómeros. El gliceraldehído tiene $2^1 = 2$; las aldohexosas, con cuatro centros quirales, tienen $2^4 = 16$ estereoisómeros. Los estereoisómeros de los monosacáridos de cada una de las longitudes de cadena de átomos de carbono pueden dividirse en dos grupos, que difieren entre ellos en la configuración alrededor del centro quiral *más distante* del grupo carbonilo. Aquellos cuya configuración en este carbono de referencia sea la misma que en el D-gliceraldehído se



Modelo de bolas y varillas



Fórmulas de proyección de Fisher



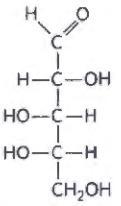
Fórmulas de perspectiva

FIGURA 7-2 Tres modos de representar los dos estereoisómeros del gliceraldehído. Los enantiómeros son imágenes especulares uno de otro. Los modelos de bolas y varillas muestran la configuración real de las moléculas. Recuerde (véase la Fig. 1-19) que en las fórmulas de perspectiva, el lado ancho de una cuña sólida se proyecta fuera del plano del papel, hacia el lector; las cuñas discontinuas apuntan hacia atrás.

denominan isómeros D, mientras que los que tengan la misma configuración que el L-gliceraldehído son los isómeros L. Dicho de otro modo, cuando el grupo hidroxilo del átomo de carbono de referencia se halla en el lado derecho (*dextro*) en la fórmula de proyección que tiene el carbono carbonílico en el extremo superior, el azúcar es un isómero D; cuando está a la izquierda (*levo*) es un isómero L. De las 16 aldohexosas posibles, ocho son D y ocho son L. La mayor parte de las hexosas presentes en los seres vivos son isómeros D. ¿Por qué son isóimeros D? Pregunta interesante sin respuesta. Recuerde que todos los aminoácidos presentes en las proteínas son exclusivamente de uno de los dos isómeros posibles, el L. También se desconoce la base de esta preferencia inicial durante la evolución; no obstante, una vez se ha seleccionado un isómero, es probable que los enzimas evolucionasen reteniendo su preferencia por ese estereoisómero.

La **Figura 7-3** muestra las estructuras de los estereoisómeros D de todas las aldosas y cetosas que tienen de tres a seis átomos de carbono. Los átomos de carbono de un azúcar se numeran empezando por el extremo de la cadena más próximo al grupo carbonilo. Cada una de las ocho D-aldohexosas, que se diferencian por su estereoquímica en los carbonos C-2, C-3 o C-4, posee su propio nombre: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, etc. (Fig. 7-3a). Las cetosas de cuatro y cinco átomos de carbono se denominan insertando el infijo "ul" en el nombre de la aldosa correspondiente; por ejemplo, la D-ribulosa es la cetopentosa que corresponde a la aldopentosa D-ribosa. (Veremos la importancia de la ribuolosa cuando examinemos la fijación del CO_2 atmosférico por las plantas verdes en el Capítulo 20). Las cetohexosas se nombran de otra forma; por ejemplo, la fructosa (del latín *fructus*, que significa "fruta"; la fruta contiene importantes cantidades de este azúcar) y la sorbosa (de *Sorbus*, un género de arbusto de montaña, cuyas bayas son ricas en el azúcar relacionado con el alcohol sorbitol). Cuando dos azúcares difieren tan sólo en la configuración alrededor de un átomo de carbono, se denominan **epímeros**; la D-glucosa y la D-manosa, que únicamente difieren en la estereoquímica en C-2, son epímeros, lo mismo que la D-glucosa y la D-galactosa (que difieren en C-4) **(Fig. 7-4)**.

Algunos azúcares se encuentran en la naturaleza en forma L; como ejemplos tenemos la L-arabinosa y los isómeros L de algunos derivados de azúcares que son componentes habituales de las glucoconjugados (Sección 7.3).



L-arabinosa

Los monosacáridos comunes tienen estructura cíclica

Hasta ahora, hemos representado las estructuras de aldosas y cetosas en forma de cadenas lineales en aras de la simplicidad (Figs. 7-3, 7-4). No obstante, las aldotetrosas y todos los monosacáridos con cinco o más átomos de carbono en su cadena suelen encontrarse en disolución acuosa en forma de estructuras cíclicas (en anillo), en las que el grupo carbonilo ha formado un enlace covalente con el oxígeno de un grupo hidroxilo perteneciente a la misma cadena. La formación de estas estructuras anulares es el resultado de una reacción general entre los alcoholes y los aldehídos o las cetonas para formar los derivados denominados **hemiacetales** o **hemicetales**. Se pueden adicionar dos moléculas de un alcohol a un carbono carbonílico; el producto de la primera adición es un hemiacetal (por adición a una aldosa) o un hemicetal (por adición a una cetosa). Si los grupos —OH y carbonilo son de la misma molécula se forma un anillo de cinco o seis átomos. La adición de la segunda molécula de alcohol produce el acetal o cetal completo **(Fig. 7-5)** y el enlace formado es un enlace glucosídico. Cuando las dos moléculas que reaccionan son ambas monosacáridos, el acetal o cetal formado es un disacárido.

La reacción con la primera molécula de alcohol crea un centro quiral adicional (el carbono carbonílico). Debido a que el alcohol se puede adicionar de dos formas diferentes, atacando por "delante" o por "detrás" del carbono carbonílico, la reacción puede producir una u otra de dos configuraciones estereoisoméricas denominadas α y β. Por ejemplo, la D-glucosa se presenta en solución como un hemiacetal intramolecular en el que el grupo hidroxilo libre en C-5 ha reaccionado con el C-1 aldehídico, que se convierte en asimétrico y da lugar a

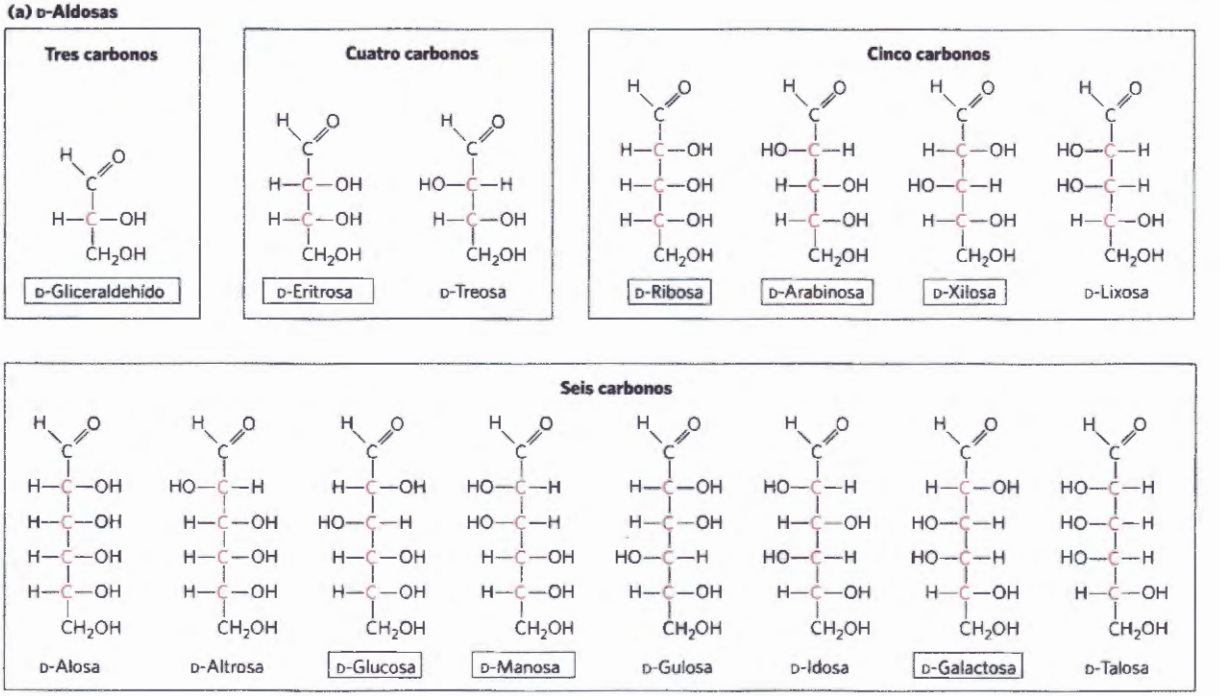


FIGURA 7-3 Aldosas y cetosas. Las series de **(a)** D-aldosas y **(b)** D-cetosas que tienen entre tres y seis átomos de carbono se presenta como fórmulas de proyección. Los átomos de carbono marcados en rojo son centros quirales. En todos estos isómeros D, el carbono quiral *más distante del carbono carbonílico* tiene la misma configuración que el carbono quiral del D-gliceraldehído. Los azúcares cuyos nombres están encuadrados son los más abundantes en la naturaleza; los encontraremos más tarde en éste y en capítulos posteriores.

los estereoisómeros designados como α y β **(Fig. 7-6)**. Las formas isoméricas de los monosacáridos que sólo difieren en su configuración alrededor del átomo de carbono hemiacetálico o hemicetálico se denominas **anómeros** mientras que el átomo de carbono carbonílico se denomina **carbono anomérico**.

Los compuestos con anillos de seis átomos se denominan **piranosas** porque son similares al compuesto cíclico con un anillo de seis átomos denominado pirano **(Fig. 7-7)**. Los nombres sistemáticos de las dos formas cíclicas de la D-glucosa son, por tanto, α-D-glucopiranosa y β-D-glucopiranosa. Las cetohexosas (tales omo la fructosa) se encuentran también como compuestos cíclicos en sus formas anoméricas α y β. En estos compuestos el grupo hidroxilo en C-5 (o C-6) reacciona con el grupo ceto en C-2, formando un anillo de **furanosa** (o de piranosa) que contiene un enlace de tipo hemicetal (Fig. 7-5). La D-fructosa forma fácilmente el anillo de furanosa (Fig. 7-7); la forma anómerica más común de este azúcar tanto combinada como en derivados es la β-D-fructofuranosa.

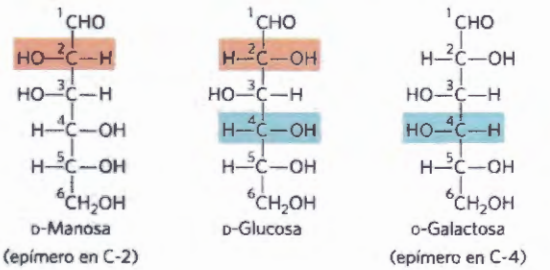


FIGURA 7-4 Epímeros. La D-glucosa y dos de sus epímeros se muestran con fórmulas de proyección. Cada epímero difiere de la D-glucosa en la configuración de un solo centro quiral (sombreado en rojo o azul).

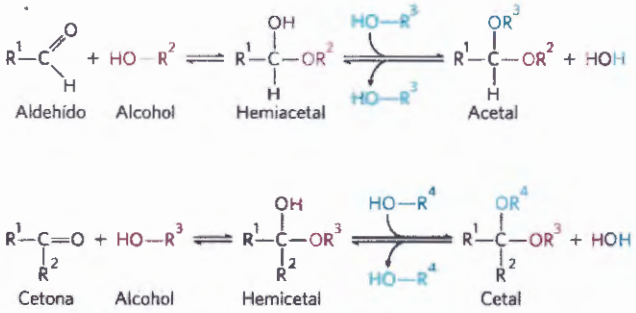


FIGURA 7-5 Formación de hemiacetales y hemicetales. Un aldehído o una cetona pueden reaccionar con un alcohol en relación 1:1 para dar lugar, respectivamente, a un hemiacetal o un hemicetal, lo que origina un nuevo centro quiral en el carbono carbonílico. La adición de una segunda molécula de alcohol da lugar a la formación de un acetal o un cetal. Cuando el segundo alcohol forma parte de otra molécula de azúcar, el enlace formado es un enlace glucosídico.

Las estructuras cíclicas de los azúcares se representan de forma más precisa en las **fórmulas en perspectiva de Haworth** que en las proyecciones de Fischer usadas normalmente para las estructuras lineales de los azúcares. En las proyecciones de Haworth el anillo de seis átomos está inclinado para que su plano sea casi perpendicular al del papel con los enlaces más próximos al lecttor dibujados más gruesos que los que están más lejos, tal como se muestra en la Figura 7-7.

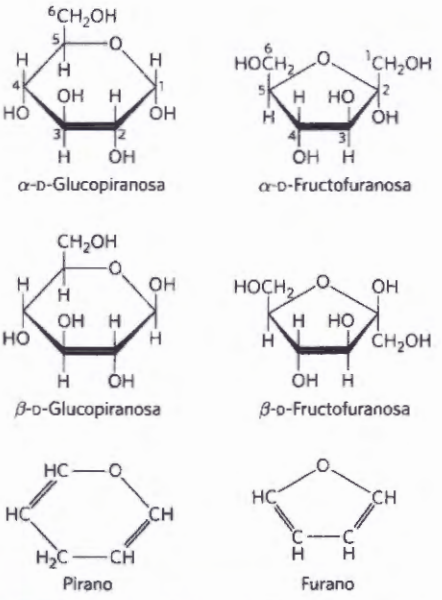


FIGURA 7-7 Piranosas y furanosas. Fórmulas de perspectiva de Haworth de las formas piranosa de la D-glucosa y furanosa de la D-fructosa. Los lados (enlaces) del anillo más cercanos al lector se representan con trazos gruesos. Los grupos hidroxilo por debajo del plano del anillo en las perspectivas de Haworth se encuentran a la derecha en las proyecciones de Fischer (compare esta figura con la Fig. 7-6). Como referencia se muestran las estructuras del pirano y el furano.

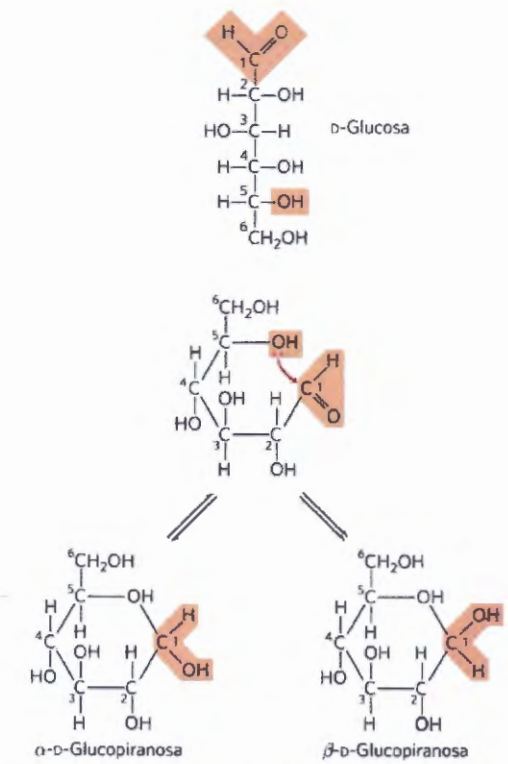
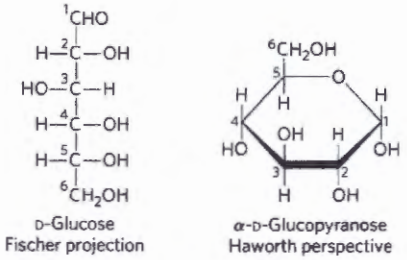


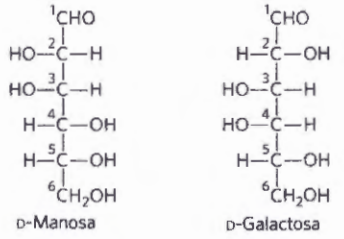
FIGURA 7-6 Formación de las dos formas cíclicas de la D-glucosa. Cuando el grupo aldehído en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 reaccionan para formar un enlace hemiacetálico, se pueden producir dos estereoisómeros, los anómeros α y β, que difieren únicamente en la estereoquímica del carbono hemiacetálico. La interconversión de los anómeros α y β se denomina mutarrotación.

» Convención Clave: Para convertir la fórmula de proyección de Fischer de cualquier D-hexosa lineal en una fórmula de perspectiva de Haworth que muestra la estructura cíclica, dibuje el anillo de seis átomos (cinco carbonos y un oxígenos, en la parte superior derecha), numere los carbonos en la dirección de las agujas del reloj empezando por el carbono anomérico y, a continuación, coloque los grupos hidroxilo. Si un grupo hidroxilo está hacia la derecha en la proyección de Fischer, se coloca apuntando hacia abajo (es decir, por debajo del plano del anillo) en la perspectiva de Haworth; si se encuentra a la izqwuierda en la proyección de Fischer, se coloca apuntando hacia arriba (es decir, por encima del plano) en la perspectiva de Haworth. El grupo $-CH_2OH$ terminal se proyercta hacia arriba en el enantiómero D y hacia abajo en el enantiómero L. El hidroxilo del carbono anomérico puede apuntar hacia arriba o hacia abajo. Cuando el hidroxilo anomérico de una D-hexosa está en el mismo lado del anillo que C-6, la estructura es, por definición, β mientras que si está en el lado opuesto de C-6, la estructura es α. **«**



EJEMPLO PRÀCTICO 7-1 Conversión de la proyección de Fischer en fórmulas de perspectiva de Haworth

Dibuje las fórmulas de perspectiva de Haworth para la D-manosa y la D-galactosa



Solución: Las piranosas son anillos de seis carbonos, por lo que debe comenzar con estructuras de Haworth de seis átomos con el átomo de oxígeno en la parte superior derecha. Numere los átomos de carbono en el sentido de las agujas del reloj, empezando por el carbono aldosa. Para la manosa coloque los hidroxilos en C-2, C-3 y C-4 por encima, por encima y por debajo, respectivamente, del anillo (ya que en la proyección de Fischer se encuentran en el lado izquierdo, izquierdo y derecho de la estructura de la manosa). Para la D-galactosa, los hidroxilos están orientados abajo, encima y encima para C-2, C-3 y C-4, respectivamente. El hidroxilo en C-1 puede estar hacia arriba o hacia abajo ya que hay dos configuraciones posibles en este carbono, α o β.

EJEMPLO PRÁCTICO 7-2 Dibujo de fórmulas de perspectiva de Haworth de azúcares isómeros

Dibuje las fórmulas de perspectiva de Haworth de α-D-manosa y β-L-galactosa.

Solución: La fórmula de perspectiva de Haworth de la D-manosa del Ejemplo práctico 7-1 puede tener el grupo hidroxilo en C-1 apuntando hacia arriba o hacia abajo. Según la Convención Clave, para la forma α, el hidroxilo en C-1 apunta hacia abajo cuando C-6 está arriba, tal como ocurre con la D-manosa.

Para la β-galactosa, utilice la representación de Fischer de la D-galactosa (vea el Ejemplo Práctico 7-1) para dibujar la representación de Fischer correcta de la L-galactosa, la cual es su imagen especular: los hidroxilos en C-2, C-3, C-4 y C-5 se encuentran a la izquierdfa, derecha, derecha e izquierda, respectivamente, Ahora dibuje la perspectiva de Haworth, un anillo de seis átomos en el que los grupos sobre C-2, C-3 y C-4 están orientados hacia arriba, abajo y abajo, respectivamente porque en la representación de Fischer están en el lado izquierdo, derecho y derecho. Dado que es la forma β, el –OH del carbono anomérico apunta hacia abajo (mismo lado que C-5).

Los anómeros α y β de la D-glucosa se interconvierten en solución acuosa mediante un proceso denominado **mutarrotación**, en el que una forma anular (por ej., el anómero α) se rompe brevement dando la forma lineal y vuelve a cerrarse produciendo el anómero β (Fig. 7-6). Así, una solución de β-D-glucosa y una solución de α-D-glucosa finalmente forman mezclas idénticas en el equilibrio con propiedades ópticas idénticas. Esta mezcla está formada por aproximadamente un tercio de α-D-glucosa, dos tercios de β-D-glucosa y cantidades muy pequeñas de las formas lineal y anular de cinco átomos (glucofuranosa).

Las fórmulas en perspectiva de Haworth tales como las mostradas en la Fig. 7-7, se emplean normalmente para representar la estereoquímica de las estructuras cíclicas de los monosacáridos. No obstante, el anillo de piranosa de seis átomos no es en realidad plano, tal como podrían sugerir las perspectivas de Haworth, sino que tiende a adoptar una de las dos conformaciones en "silla" **(Fig. 7-8)**. Recuérdese del Capítulo 1 (pp. 16-19) que dos *conformaciones* de una molécula son interconvertibles sin necesidad de proceder a la rotura de ningún enlace covalente, mientras que dos *configuraciones* sólo pueden interconvertirse después de la rotura de un enlace covalente. Para interconvertir las configuraciones α y β, ha de romperse el enlace en el que participa el átomo de oxígeno del anillo mientras que la interconversión de las dos formas en silla (que son *confórmeros*) no requiere rotura de enlace y no cambia la configuración de ninguno de los carbonos del anillo. Veremos más adelante que las estructuras tridimensionales específicas de las unidades de monosacárido son importantes en la determinación de las propiedades biológicas y función de algunos polisacáridos.

Los organismos contienen numerosos derivados de las hexosas

Además de las hexosas simples tales como la glucosa, la galactosa y la manosa, existen una serie de derivados de los azúcares en los que un grupo hidroxilo del compues-

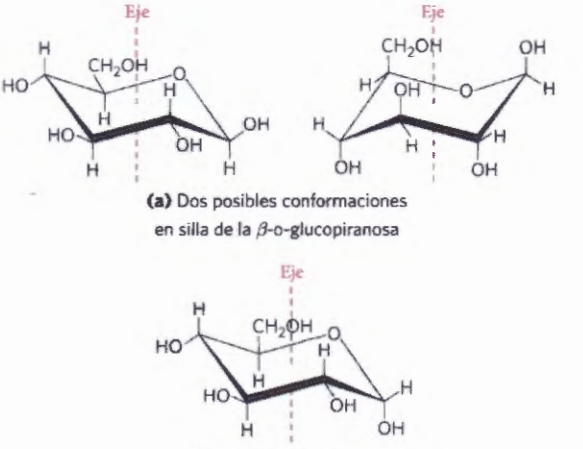


FIGURA 7-8 Fórmulas conformacionales de las piranosas. (a) Dos formas conformacionales en silla del anillo de la β-D-glucopiranosa Dos *confórmeros* tales como los mostrados no son fácilmente interconvertibles; se requiere una incorporación de unos 46 kj de energía por mol de azúcar para forzar la interconversión de las formas en silla. Otra conformación, en "nave" (no mostrada), sólo se observa en derivados con sustituyentes muy voluminosos. **(b)** Conformación en silla preferida de la α-D-glucopiranosa.

to original está reemplazado por otros sustituyentes o bien uno de los átomos de carbono se encuentra oxidado en forma de grupo carboxílico **(Fig. 7-9)**. En la glucosamina, la galactosamina y la manosamina, el grupo hidroxilo en C-2 del compuesto original se halla reemplazado por un grupo amino. El grupo amino casi siempre está condensado con ácido acético, tal como sucede en el caso de la *N*-acetilglucosamina. Este derivado de la glucosamina forma parte de muchos polímeros estructurales, entre los que se encuentran los de la pared de la célula bacteriana. La sustitución del grupo hidroxilo en C-6 de la L-galactosa o la L-manosa por un hidrógeno da lugar a L-fucosa y L-ramnosa, respectivamente. La L-fucosa se encuentra en los oligosacáridos complejos de glucoproteínas y glucolípidos; la L-ramnosa se encuentra en los polisacáridos de plantas.

Cuando el carbono carbonílico (aldehídico) de la glucosa se oxida a nivel de carboxilo se produce ácido glucónico utilizado en medicina como un contraión inocuo con el que se administran fármacos cargados positivamente (tales como la quinina) o iones (por ej., Ca^{2+}). Otras aldosas dan lugar a otros **ácidos aldónicos**. La oxidación del carbono del otro extremo de la cadena (el C-6 de glucosa, galactosa o manosa) da lugar al correspondiente **ácido urónico**: glucurónico, galacturónico o manurónico. Tanto los ácidos aldónicos como los urónicos forman ésteres intramoleculares estables denominados lactonas (Fig. 7-9, abajo a la izquierda). Los ácidos siálicos son una familia de azúcares con el mismo esqueleto de nueve carbonos. Uno de ellos, el ácido *N*-acetilneuramínico (a menudo conocido simplemente como "ácido siálico"), es un derivado de la *N*-acetilmanosamina, componente de muchas glucoproteínas y glucolípidos de la superficie de células animales que proporcionan sitios de reconocimiento por otras células o proteínas fijadoras de glúcidos. Los grupos ácido carboxílico de estos derivados acídicos de azúcares están ionizados a pH 7 y, por tanto, estos compuestos se pueden denominar correctamente como carboxilatos (glucuronato, galacturonato, etc.)

En la síntesis y metabolismo de glúcidos los intermedios no suelen ser los mismos azúcares, sino sus derivados fosforilados. La condensación del ácido fosfórico con uno de los grupos hidroxilo de un azúcar da

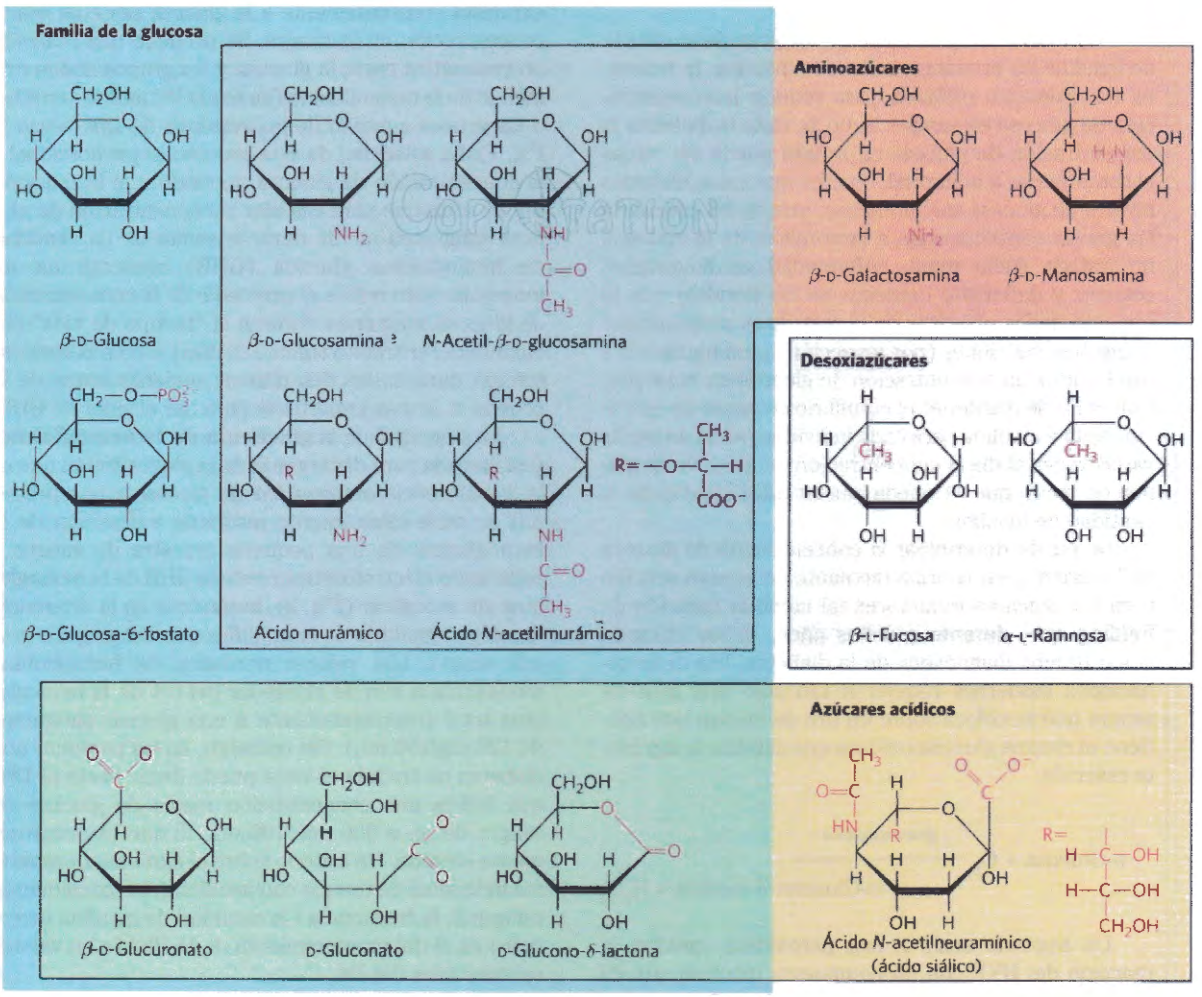


FIGURA 7-9 Algunos derivados de las hexosas de importancia en biología. En los aminoazúcares, un grupo —NH2 reemplaza a uno de los grupos —OH de la hexosa original. La sustitución de un —OH por un —H da lugar a un desoxiazúcar. Obsérvese que los desoxiazúcares mostrados aquí se encuentran en la naturaleza en forma de isómeros L. Los azúcares acídicos contienen un grupo carboxilato, que les confiere una carga negativa a pH neutro. La D-glucono-δ-lactona se forma a partir de ácido glucónico por formación de un enlace éster entre el grupo carboxilato en C-1 y el grupo hidroxilo en C-5 (también denominado carbono δ) del D-gluconato.

lugar a un éster fosfato, como, por ejemplo, la glucosa-6-fosfato (Fig. 7-9), primer metabolito de la ruta mediante la cual la mayoría de organismos oxidan la glucosa para obtener energía. Los fosfatos de azúcares son relativamente estables a pH neutro y tienen una carga negativa. Uno de los efectos de la fosforilación de los azúcares en las células es su retención en el interior de las mismas; en general, las células no poseen transportadores en la membrana plasmática que permitan el paso de los azúcares fosforilados. La fosforilación también activa a los azúcares para su posterior transformación química. Algunos derivados fosforilados importantes de los azúcares son componentes de los nucleótidos (tratados en el capítulo siguiente).

RECUADRO 7-1 MEDICINA Determinación de la glucosa sanguínea en el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes

La glucosa es el principal combustible del cerebro. Cuando la cantidad de glucosa que llega al cerebro es demasiado baja, las consecuencias pueden ser espantosas: letargia, coma, lesión cerebral permanente y muerte (véase la Fig. 23-25). Se han desarrollado mecanismos hormonales complejos para asegurar que la concentración de glucosa en la sangre permanece suficientemente elevada (alrededor de 5 mM) para satisfacer las necesidades del cerebro, pero no demasiado elevada porque una concentración de glucosa en sangre elevada puede tener consecuencias fisiológicas graves.

Los individuos con diabetes mellitus dependiente de insulina no producen suficiente insulina, la hormona normalmente utilizada para reducir la concentración de glucosa en sangre. Si no se trata la diabetes la concentración de glucosa en sangre puede ser varias veces superior a la normal. Se cree que estos elevados niveles de glucosa son, al menos, una de las causas de las graves consecuencias a largo plazo de la diabetes no tratada (fallo renal, enfermedad cardiovascular, ceguera y deficiente curación de las heridas) por lo que uno de los objetivos de la terapia es proporcionar la insulina suficiente (por inyección) para mantener a nivel normal la concentración de glucosa en la sangre. Con el fin de mantener el equilibrio correcto de ejercicio, dieta e insulina para cada individuo, se ha de medir varias veces al día la concentración de glucosa sanguínea de modo que se pueda ajustar adecuadamente la cantidad de insulina.

Se puede determinar la concentración de glucosa en la sangre y en la orina mediante un ensayo sencillo para los azúcares reductores tal como la reacción de Fehling que, durante muchos años, se ha utilizado como prueba diagnóstica de la diabetes. Las determinaciones modernas requieren tan solo una gota de sangre que se coloca sobre un tira de ensayo que contiene el enzima glucosa oxidasa que cataliza la siguiente reacción:

$$\text{D-Glucosa} + O_2 \xrightarrow{\text{glucosa oxidasa}} \text{D-Glucono-}\delta\text{-lactona} + H_2O_2$$

Un segundo enzima, una peroxidasa, cataliza la reacción del H^2O^2 con un compuesto incoloro que da un producto coloreado el cual se cuantifica con un fotómetro sencillo que lee la concentración de glucosa sanguínea.

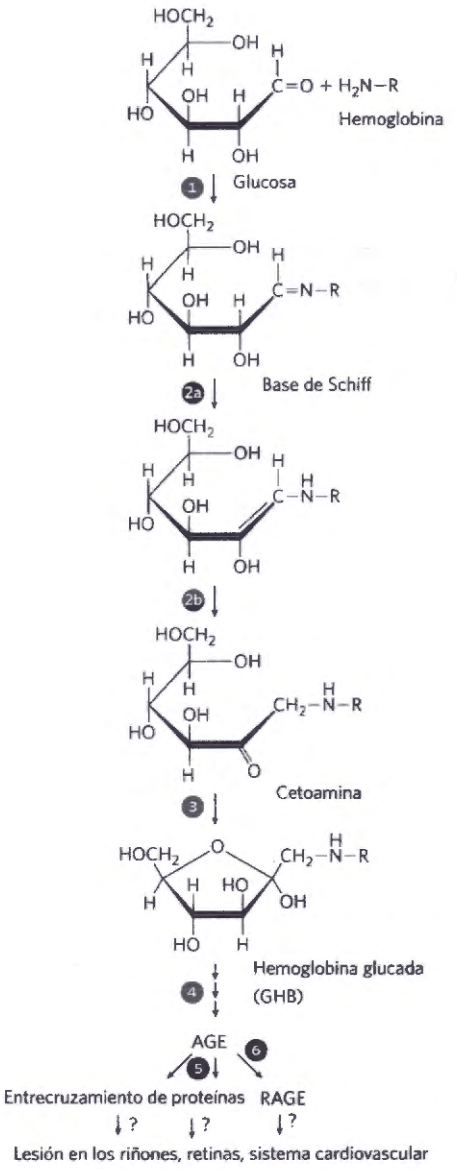
Dado que la concentración de glucosa en sangre cambia con el horario de las comidas y del ejercicio, una única medida no refleja necesariamente el *promedio* de la glucosa sanguínea durante horas o días por lo que pueden pasar desapercibidas elevaciones peligrosas. Se puede evaluar la concentración de glucosa media analizando su efecto sobre la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno en los eritrocitos. Transportadores presentes en la membrana del eritrocito equilibran las concentraciones de glucosa intracelular y plasmática de modo que la hemoglobina está expuesta constantemente a la glucosa sea cual sea la concentración en la sangre. Se produce una reacción no enzimática entre la glucosa y los grupos amino primarios de la hemoglobina (ya sea la Val amino-terminal o los grupos ε-amino de los residuos de Lys; véase la Fig. 1). La velocidad de este proceso es proporcional a la concentración de glucosa de modo que la reacción puede utilizarse para calcular la concentración de glucosa sanguínea media durante semanas. La cantidad de hemoglobina glucada (GHB) presente en un momento dado refleja el promedio de la concentración de glucosa sanguínea durante el "tiempo de vida" circulante del eritrocito (unos 120 días) si bien la concentración durante las dos últimas semanas antes de la prueba es la más importante para dar el valor de GHB.

La magnitud de la **glucación de la hemoglobina** (así llamada para distinguirla de la glucosilación que es la transferencia *enzimática* de glucosa a una proteína) se mide clínicamente mediante extracción de la hemoglobina de una pequeña muestra de sangre y separando electroforéticamente la GHB de la hemoglobina sin modificar (Fig. 2), basándose en la diferencia de carga resultado de la modificación del grupo o grupos amino. Los valores normales de hemoglobina monoglucada son de alrededor del 5% de la hemoglobina total (correspondiente a una glucosa sanguínea de 120 mg/100 mL). Sin embargo, en las personas con diabetes no tratada el valor puede llegar hasta el 13% que indica una concentración media de glucosa en sangre de unos 300 mg /100 mL, lo que es peligrosamente elevado. Un criterio sobre el éxito de un programa individual de terapia con insulina (el espaciamiento temporal, la frecuencia i la cantidad de insulina inyectada) es el del mantenimiento de la HbA1c en valores aproximados del 7%.

Los monosacáridos son agentes reductores

Los monosacáridos pueden ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves tales como el ión cúprico (Cu^{2+}) **(Fig. 7-10)**. El carbono carbonílico se oxida a grupo carboxílico. La glucosa y otros azúcares capaces de reducir iones cúpricos se denominan **azúcares reductores**; los azúcares se oxidan dando una mezcla compleja de ácidos carboxílicos. Esta propiedad es la base de la reacción de Fehling, un ensayo semicuantitativo que indica la presencia de azúcares reductores. Durante muchos años se utilizó este procedimiento para la determinación de niveles elevados de glucosa en sangre y orina en el diagnóstico de la

FIGURA 1 La reacción no enzimática de la glucosa con un grupo amino primario de la hemoglobina empieza con ❶ formación de una base de Schiff, la cual ❷ experimenta el reordenamiento que genera un producto estable; ❸ esta cetoamina puede continuar su ciclación dando GHB. ❹ Reacciones posteriores generan los productos finales de la glucación avanzada (AGE) tales como ε-*N*-carboximetil-lisina y metilglioxal, compuestos que ❺ pueden dañar otras proteínas al entrecruzarse con ellas lo que da lugar a cambios patológicos. ❻ El receptor de AGE (RAGE), activado por AGE, estimula efectos posteriores, entre ellos la inflamación.



En la reacción de glucación de la hemoglobina, el primer paso (formación de una base de Schiff) va seguido de una serie de reordenamientos, oxidaciones y deshidrataciones de la porción glucídica que da lugar a una mezcla heterogénea de AGE (del inglés *a*dvanced *g*lycation *e*nd products). Estos productos pueden abandonar el eritrocito y formar entrecruzamientos covalentes entre proteínas que interfieren con la función normal de las proteínas (Fig. 1). La acumulación de concentraciones relativamente elevadas de AGE en personas con diabetes puede, por entrecruzamiento de proteínas importantes, ser causa de las lesiones de riñones, retinas y sistema cardiovascular que son características de la enfermedad. Este proceso patogénico constituye una diana potencial para la acción medicamentosa. Los AGE también actúan a través de receptores transmembrana de AGE, o RAGE, que desencadenan la respuesta inflamatoria asociada con la diabetes.

Inyección de analito	Porcentaje	Tiempo (min)	Área
A1a	0,4	0,30	8.051
A1b	1,0	0,45	19.267
A1c	5,9	1,10	110.946
A0	92,6	1,56	1.727.669
		Área total	1.883.615

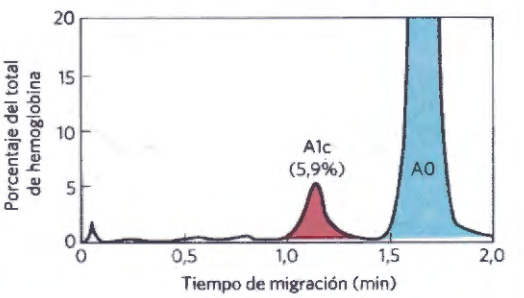


FIGURA 2 Patrón de hemoglobina (detectado por su absorción a 415 nm) después de la separación electroforética de las formas no glucada (A0) y mononoglucada (A1c) en un capilar de vidrio. La integración de las áreas debajo de los picos permite calcular la cantidad porcentual de GHB (AbA1c) respecto a la hemoglobina total. Aquí se muestra el perfil de un individuo con un nivel normal de HbA1c (5,9%).

diabetes mellitus. Hoy en día, se utilizan métodos más sensibles en los que se utiliza un enzima inmovilizado sobre una tira de ensayo; necesitan una sola gota de sangre (Recuadro 7-1). ■

Los disacáridos contienen un enlace glucosídico

Los disacáridos (tales como la maltosa, la lactosa y la sacarosa) están formados por dos monosacáridos unidos covalentemente mediante un **enlace *O*-glucosídico**, que se forma cuando un grupo hidroxilo de un azúcar, normalmente cíclico, reacciona con el carbono anomérico del otro (Fig. 7-10). Esta reacción da lugar a la formación de un acetal a partir de un hemiacetal (tal como la glucopiranosa) y un alcohol (un grupo hidroxilo de una segunda molécula de azúcar) (Fig. 7-5). El compuesto resultante se denomina glucósido. Los enlaces glucosídicos se hidrolizan con facilidad por acción de ácidos pero son resistentes a la hidrólisis básica. Por lo tanto, los disacáridos pueden hidrolizarse para dar lugar a sus componentes monosacáridos por ebullición en un medio que contenga ácido diluído. Los **enlaces *N*-glucosídicos** unen el carbono anomérico de un azúcar y un átomo de nitrógeno en las glucoproteínas (véase la Fig. 7-30) y los nucleótidos (véase la Fig. 8-1).

La oxidación de un azúcar por iones cúpricos (la reacción que define a los azúcares reductores) tiene lugar solamente en la forma lineal, que está en equilibrio con la forma o formas cíclicas. Cuando el carbono anomérico participa en un enlace glucosídico (es decir, cuando el compuesto es un acetal o cetal completo; véase la Fig. 7-5) se impide la interconversión entre las formas lineales y cíclicas mostradas en la Figura 7-6. Dado que el carbono carbonílico sólo puede ser oxidado cuando el azúcar se encuentra en la forma lineal la formación de un enlace glucosídico transforma el azúcar en no reductor. Al describir disacáridos o polisacáridos, el extremo de una cadena que contiene un carbono anomérico libre (es decir, aquél que no establece un enlace glucosídico) se suele conocer como **extremo reductor**.

El disacárido maltosa (Fig. 7-10) contiene dos residuos de D-glucosa unidos mediante un enlace glucosídico entre el C-1 (el carbono anomérico) de un residuo de glucosa y el C-4 de otro. La maltosa es un disacárido reductor porque mantiene un carbono anomérico libre (el C-1 del residuo de glucosa situado a la derecha en la Fig. 7-10). La configuración del átomo de carbono anomérico del enlace glucosídico es α. El residuo de glucosa con un carbono anomérico libre puede existir tanto en la forma piranosa α- como en la β-.

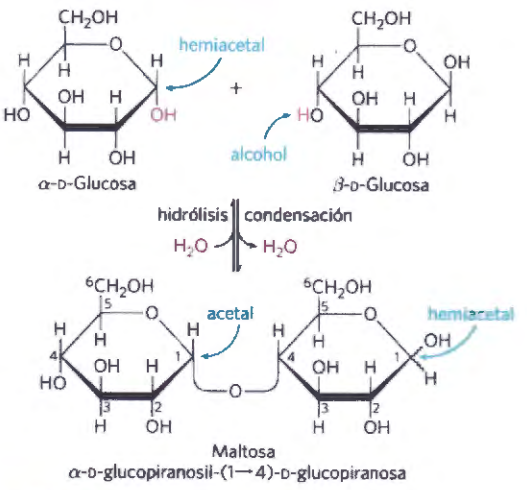


FIGURA 7-10 Formación de maltosa. Un disacárido se forma a partir de dos monosacáridos (en este caso, dos moléculas de D-glucosa) cuando un -OH (alcohol) de una molécula de monosacárido (derecha) se condensa con el hemiacetal intramolecular de otra molécula (izquierda), con eliminación de H_2O y formación de un enlace glucosídico. La reacción inversa es la de hidrólisis (ataque del enlace glucosídico por parte de H_2O). La molécula de maltosa, mostrada aquí, retiene un hemiacetal reductor en el C-1 no implicado en el enlace glucosídico. Como la mutarrotación interconvierte las formas α y β del hemiacetal, a menudo, los enlaces en esta posición se representan con líneas onduladas para indicar que la estructura puede ser tanto α como β.

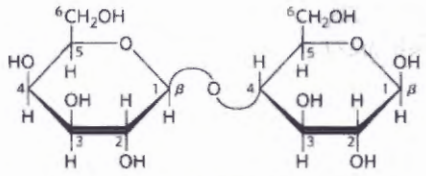
» **Convención Clave:** Deben seguirse algunas reglas con el fin de poder denominar sin ambigüedades disacáridos reductores en especial los oligosacáridos más complejos. Por convención, el nombre describe el compuesto escrito con su extremo no reductor a la izquierda mientras que el nombre "se construye" siguiendo el siguiente orden. (1) Se da la configuración (α o β) del átomo de carbono anomérico que une la primera unidad de monosacárido (izquierda) con la segunda. (2) Se nombra el residuo no reductor; para distinguir entre estructuras con anillos de cinco o seis átomos, se inserta el infijo "furano" o "pirano" en el nombre. (3) Los dos átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico se indican entre paréntesis, con una flecha que conecta los dos números; por ejemplo, (14) indica que el C-1 del primer residuo de azúcar se une al C-4 del segundo. (4) Se nombra el segundo residuo. Si existe un tercer residuo, se describe a continuación el segundo enlace glucosídico siguiendo las mismas convenciones. (Para hacer más corta la descripción de un polisacárido complejo se utilizan a menudo abreviaturas de tres letras o símbolos coloreados para cada monosacárido tal como se muestra en la Tabla 7-1). Siguiendo esta convención para la nomenclatura de los oligosacáridos, la maltosa es la α-D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucopiranosa. Puesto que la mayor parte de los azúcares que encontraremos en este libro son enantiómeros de la serie D y la forma piranosa es predominante entre las hexosas, en general emplearemos una versión reducida del nombre formal de este tipo de compuestos, en la que se especifica la configuración del carbono anomérico y cuáles son los átomos de carbono unidos por el enlace glucosídico. En esta nomenclatura abreviada, la maltosa es Glc(α1→4) Glc. «

El disacárido lactosa **(Fig. 7-11)**, que da lugar a D-galactosa y D-glucosa por hidrólisis, se encuentra en la leche. El carbono anomérico del residuo de glucosa puede ser oxidado y la lactosa es, por tanto, un disacárido reductor. Su nombre abreviado es Gal(β1→4)Glc. El enzima lactasa –ausente en los individuos con intolerancia a la lactosa- empieza el proceso digestivo en el intestino delgado rompiendo el enlace (β1→4) de la lactosa y dando monosacáridos que se absorben en el intestino delgado. La lactosa, al igual que otros disacáridos, no se absorbe en el intestino delgado y, en los individuos con intolerancia a la lactosa, pasa al intestino grueso. Allí,

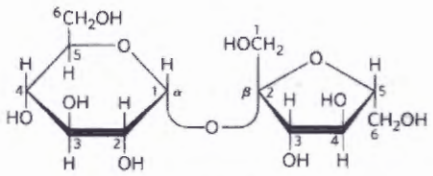
TABLA 7-1 Símbolos y abreviaturas de monosacáridos comunes y de algunos de sus derivados

Abecuosa	Abe	Ácido glucurónico	GlcA
Arabinosa	Ara	Galactosamina	GalN
Fructosa	Fru	Glucosamina	GlcN
Fucosa	Fuc	*N*-Acetilgalactosamina	GalNAc
Galactosa	Gal	*N*-Acetilglucosamina	GlcNAc
Glucosa	Glc	Ácido idurónico	IdoA
Manosa	Man	Ácido murámico	Mur
Ramnosa	Rha	Ácido *N*-acetilmurámico	Mur2Ac
Ribosa	Rib	Ácido	
Xilosa	Xyl	*N*-acetilneuramínico (ácido siálico)	Neu5Ac

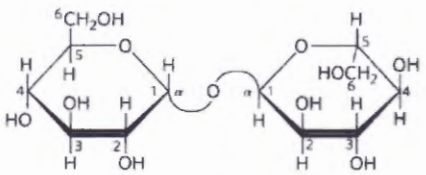
Nota: En una convención utilizada frecuentemente, las hexosas se representan como círculos, las *N*-acetilhexosaminas como cuadrados y las hexosaminas como cuadrados divididos por una diagonal. Todos los azúcares con la configuración "gluco" son azules, los de la configuración "galacto" son amarillos y los azúcares "mano" son verdes. Se pueden añadir otros sustituyentes a medida que se necesiten: sulfato (S), fosfato (P), *O*-acetil (OAc) u *O*-metil (OMe).



Lactosa (forma β)
β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosa
Gal(β1→4)Glc



Sacarosa
β-D-fructofuranosil α-D-glucopiranósido
Fru(2β↔α1)Glc ≡ Glc(α1↔2β)Fru



Trehalosa
(α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranósido)
Glc(α1↔1α)Glc

FIGURA 7-11 Algunos disacáridos comunes. Al igual que en el caso de la maltosa de la Figura 7-10, se representan en perspectivas de Haworth. Se muestran los nombres comunes, los nombres sistemáticos completos y sus abreviaturas para cada disacárido. La nomenclatura formal de la sacarosa nombra a la glucosa como glucósido original aunque, se dibuja típicamente en la forma mostrada en la que la glucosa se halla a la izquierda.

elaumento de la osmolaridad debido a la lactosa disuelta se opone a la absorción de agua desde el intestino al torrente circulatorio, lo que produce excrementos líquidos poco ligados. Además, la fermentación de la lactosa por las bacterias intestinales produce grandes cantidades de CO_2, lo que lleva a hinchazón, rampas y gas asociados a la intolerancia a la lactosa.

La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales. Al contrario que la maltosa y la lactosa, la sacarosa no contiene ningún carbono anomérico libre; los carbonos anoméricos de las dos unidades monosacáridas se encuentran formando el enlace glucosídico (Fig. 7-11). Por tanto, la sacarosa es un azúcar no reductor y su resistencia a la oxidación hace que sea una molécula adecuada para el almacenamiento y transporte de energía en las plantas. En la nomenclatura abreviada, una doble flecha conecta los símbolos que especifican los carbonos anoméricos y sus configuraciones. Así, el nombre abreviado de la sacarosa es indistintamente Glc(α1↔2β)Fru o Fru(2β↔α1)Glc. La sacarosa en un producto intermedio principal de la fotosíntesis; en muchas plantas constituye la forma principal para el transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta.

La trehalosa, Glc(α1↔1α)Glc (Fig. 7-11), es un disacárido de D-glucosa y, al igual que la sacarosa, es un azúcar no reductor. La trehalosa es un constituyente principal del fluído circulante (hemolinfa) de los insectos, con papel de reserva energética.

La lactosa confiere a la leche su sabor dulce y la sacarosa, por supuesto, es el azúcar de mesa. La trehalosa también se utiliza como edulcorante. En el Recuadro 7-2 se explica de que modo los humanos detectan la dulzor y cómo actúan los edulcorantes artificiales tales como el aspartamo.

RESUMEN 7.1 Monosacáridos y disacáridos

- Los azúcares (también llamados sacáridos) son compuestos que contienen un grupo aldehído o cetona y dos o más grupos hidroxilo.
- Los monosacáridos generalmente contienen varios carbonos quirales y, por tanto, existen en diversas formas estereoquímicas, que se pueden representar sobre el papel según la proyección de Fischer. Los epímeros son azúcares que difieren en configuración en un solo átomo de carbono
- Por lo general los monosacáridos forman hemiacetales y hemicetales internos en los que el grupo aldehído o cetona se une con un grupo hidroxilo de la misma molécula creando una estructura cíclica; esto se puede representar mediante una fórmula de perspectiva de Haworth. El átomo de carbono que se encontraba originariamente en el grupo aldehído o cetona (el carbono anomérico) puede adoptar una de las dos configuraciones, α y β, que son interconvertibles por mutarrotación. En la forma lineal del monosacárido, que está en equilibrio con las formas cicladas, el carbono anomérico se oxida fácilmente convirtiendo el compuesto en un azúcar reductor.
- Un grupo hidroxilo de un monosacárido puede reaccionar con el carbono anomérico de un segundo monosacárido formando un acetal denominado glucósido. En este disacárido, el enlace glucosídico protege al carbono anomérico de la oxidación convirtiéndolo en un azúcar no reductor.

RECUADRO 7-2 El azúcar es dulce, pero....algunas otras cosas también

El sabor dulce es uno de los cinco sabores básicos que pueden notar los humanos (Fig. 1); los restantes son ácido, amargo, salado y umami. El sabor dulce es detectado por receptores proteicos de la membrana plasmática de las células gustatorias de la superficie de la lengua. En los humanos, dos genes muy relacionados (*TIR2* y *TIR3*) codifican los receptores del dulzor (Fig. 2). Cuando una molécula con la estructura compatible se une a estos receptores en el dominio extracelular de una célula gustatoria, desencadena una serie de acontecimientos en la célula (incluida la activación de una proteína fijadora de GTP; véase la Fig. 12-16) que generan una señal eléctrica al cerebro que se interpreta allí como "dulce". Durante la evolución ha habido, probablemente, una selección hacia la capacidad de saborear compuestos que se encuentran en alimentos que contienen nutrientes importantes tales como los glúcidos que son combustibles principales en muchos organismos. Los azúcares más sencillos, entre ellos la sacarosa, glucosa y fructosa tienen sabor dulce, aunque existe otra clase de compuestos que también se unen a los receptores del sabor dulce: los aminoácidos glicina, alanina y serina son ligera-



FIGURA 1 Un estímulo potente para los receptores del sabor dulce. [Fuente: David Cook/blueshiftstudios/Alamy.]

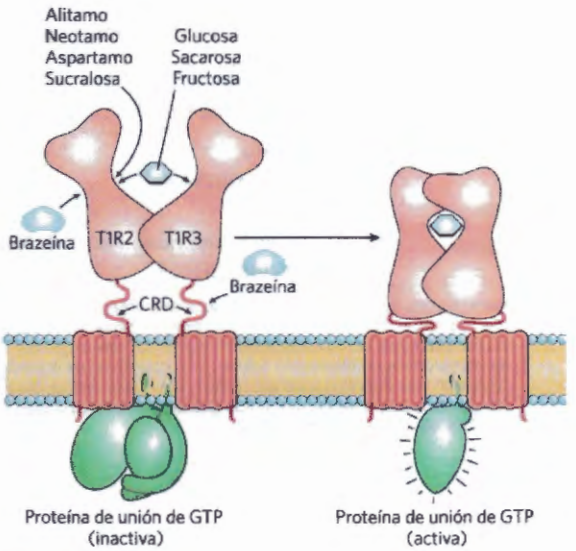


FIGURA 2 Receptor de las sustancias con sabor dulce, con sus regiones de interacción (flechas cortas) en el que se indican diversos compuestos de sabor dulce. Cada receptor tiene un dominio extracelular, un dominio rico en cisteína (CRD) y un dominio de membrana con varias hélices transmembrana, una característica común de los receptores de señales. Los edulcorantes artificiales se unen sólo a una de las dos subunidades del receptor; los azúcares naturales se unen a las dos. Véase el Capítulo 1, Problema 16 para las estructuras de muchos de estos edulcorantes artificiales. [Fuente: Información de F. M. Assadi-Porter et al., *J. Mol. Biol.* 398:584, 2010, Fig. 1.]

■ Los oligosacáridos son polímeros cortos de varios monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. En un extremo de la cadena, el extremo reductor, se encuentra una unidad monosacárida cuyo carbono anomérico no está formando un enlace glucosídico.

■ La nomenclatura común de los di- u oligosacáridos especifica el orden de las unidades monosacáridas, la configuración en cada carbono anomérico y los átomos de carbono que forman el o los enlaces glucosídicos.

7.2 Polisacáridos

La mayoría de glúcidos naturales se encuentran en forma de polisacáridos, polímeros de medio a alto peso molecular (M_r >20.000). Los polisacáridos, denominados también **glucanos**, difieren entre sí en la naturaleza de sus unidades monoméricas repetitivas, en la longitud de sus cadenas, en los tipos de enlace que se forman entre las unidades y en su grado de ramificación. Los **homopolisacáridos** contienen un único tipo de monómero; los **heteropolisacáridos** contienen dos o más tipos diferentes **(Fig. 7-12)**. Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de monosacáridos

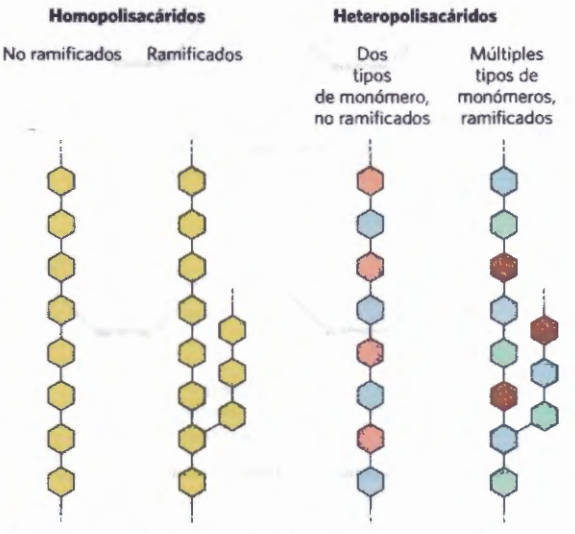


FIGURA 7-12 Homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Los polisacáridos pueden estar compuestos por uno, dos o varios monosacáridos diferentes y formar cadenas lineales o ramificadas de longitud diversa.

mente dulces e inocuos; el nitrobenceno y el etilenglicol tienen un fuerte sabor dulce pero son tóxicos. (Véase el Recuadro 18-2 sobre un notable misterio médico producido por envenenamiento con etilenglicol.) Diversos productos naturales son extraordinariamente dulces: el esteviósido, un derivado de azúcar aislado de la planta *Stevia rebaudiana* Berton, es varios centenares de veces más dulce que una cantidad equivalente de sacarosa (azúcar de mesa) y la pequeña proteína brazeina (54 aminoácidos), aislada de los frutos de la parra Oubli (*Pentadiplandra brazzeana* Baillon) del Gabón y Camerún, es 17.000 veces más dulce, en términos molares, que la sacarosa. Probablemente el sabor dulce de los frutos favorece su consumo por los animales, los cuales dispersan seguidamente las semillas de modo que pueden crecer nuevas plantas.

Existe un gran interés en el desarrollo de edulcorantes artificiales como ayuda para la pérdida de peso, compuestos que confieren un sabor dulce a los alimentos sin añadir las calorías presentes en los azúcares. El edulcorante artificial aspartamo demuestra la importancia de la esteroquímica en biología (Fig. 3). Según un modelo sencillo de unión al receptor del sabor dulce, en la unión participan tres sitios en el receptor: AH^+, B^- y X. El sitio AH^+ contiene algún grupo (un alcohol o amina) que puede formar un puente de hidrógeno con una carga negativa parcial, tal como un oxígeno carbonílico, de la molécula de edulcorante; el ácido carboxílico del aspartamo contiene un oxígeno de este tipo. El sitio B^- contiene un grupo con un oxígeno parcialmente negativo disponible para formar un enlace de hidrógeno con un átomo parcialmente positivo de la molécula edulcorante, tal como el grupo amino del aspartamo. El sitio X está orientado perpendicular a los otros dos grupos y puede interaccionar con una zona hidrofóbica de la molécula edulcorante, tal como el anillo bencénico del aspartamo.

Cuando el emparejamiento estérico es correcto, tal como sucede en la parte izquierda de la Figura 3, se estimula el receptor del sabor dulce y la señal "dulzor" es conducida al cerebro. Cuando el emparejamiento no es correcto, tal como sucede en la parte derecha de la Figura 3, no se estimula el receptor del sabor dulce; de hecho, en este caso, se estimula otro receptor (del gusto amargo) por el estereoisómero "equivocado" del aspartamo. Realmente, ¡la estereoisomería es importante!

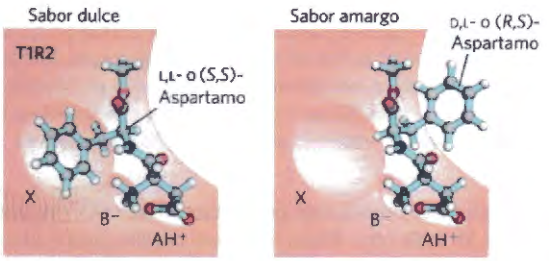


FIGURA 3 Base estereoquímica del sabor de los dos isómeros del aspartamo. [Fuente: Información de http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/549receptor.html. © Charles E. Ophardt, Elmhurst College.]

que se usan como combustible biológico; el almidón y el glucógeno son homopolisacáridos de este tipo. Otros homopolisacáridos (como por ejemplo la celulosa y la quitina) actúan como elementos estructurales en las paredes celulares de plantas y en el exoesqueleto de algunos animales. Los heteropolisacáridos proporcionan soporte extracelular a organismos de todos los reinos. Por ejemplo, la capa rígida de la envoltura de la célula bacteriana (el péptidoglucano) está compuesta, en parte, por un heteropolisacárido formado por dos unidades alternantes de monosacáridos (véase la Fig. 6-28). En los tejidos animales, el espacio extracelular se encuentra ocupado por diversos tipos de heteropolisacáridos, que forman una matriz que mantiene unidas a las células individuales y proporciona protección, forma y soporte a células, tejidos y órganos.

A diferencia de las proteínas, los polisacáridos no suelen tener masas moleculares definidas. Ello se debe a los diferentes mecanismos de formación de los dos tipos de polímeros. Tal como se verá en el Capítulo 27, las proteínas se sintetizan a partir de un molde (RNA mensajero), de secuencia y longitud definidas, por acción de enzimas que copian el molde con fidelidad. No hay molde para la síntesis de polisacáridos; en lugar de ello, el programa para la síntesis de polisacáridos depende tan solo de los enzimas que catalizan la polimerización de las unidades monoméricas, y no hay un punto específico para la finalización del proceso de síntesis; así, los productos son de longitud variable.

Algunos homopolisacáridos son formas de almacenamiento de combustible

Los polisacáridos de reserva más importantes son el almidón de las células vegetales y el glucógeno de las células animales. Ambos polisacáridos se encuentran en el interior de la célula formando agregados o gránulos. Las moléculas de almidón y glucógeno están muy hidratadas porque tienen muchos grupos hidroxilo expuestos que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. La mayor parte de las células vegetales tienen capacidad para sintetizar almidón (véase la Fig. 20-5), pero el almacenamiento de este compuesto es especialmente abundante en tubérculos (tallos subterráneos), tales como la patata, y en las semillas.

El **almidón** contiene dos tipos de polímero de glucosa, la amilosa y la amilopectina **(Fig. 7-13)**. La amilosa consiste en cadenas largas y sin ramificar de residuos de

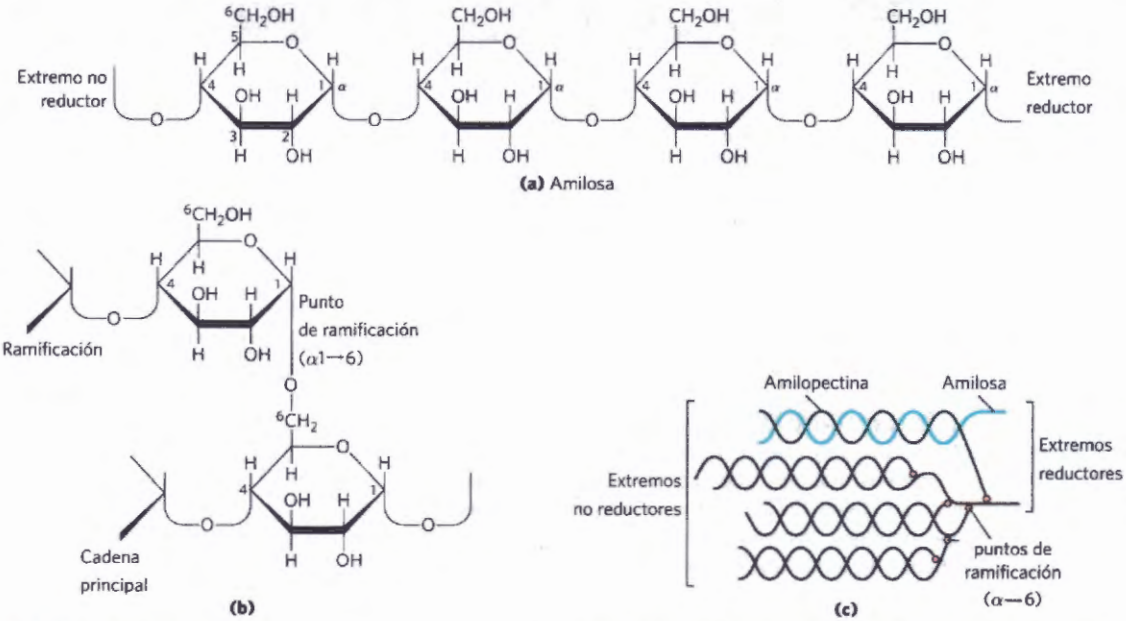


FIGURA 7-13 Glucógeno y almidón. **(a)** Un pequeño fragmento de amilosa, un polímero lineal de residuos de D-glucosa unidos por enlaces ($\alpha\rightarrow4$). Cada cadena puede contener varios miles de residuos de D-glucosa. La amilopectina presenta segmentos de residuos unidos de forma similar entre los puntos de ramificación. El glucógeno tiene la misma estructura básica pero está más ramificado que la amilopectina. **(b)** Un punto de ramificación ($\alpha1\rightarrow6$) del glucógeno o de la amilopectina. **(c)** Un agregado de amilosa y amilopectina del tipo que podría encontrarse en los gránulos de almidón. Las cadenas de amilopectina (en negro) forman una estructura de doble hélice entre sí o con cadenas de amilosa (en azul). La amilopectina tiene frecuentes puntos de ramificación ($\alpha1\rightarrow6$) (en rojo). Los residuos de glucosa en los extremos no reductores de las ramificaciones externas se eliminan enzimáticamente durante la movilización del almidón para la producción de energía. El glucógeno tiene una estructura similar, pero se encuentra más ramificado y es más compacto.

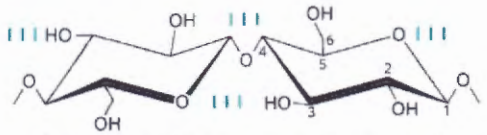
D-glucosa conectadas por enlaces ($\alpha1\rightarrow4$) (al igual que en la maltosa). Estas cadenas oscilan entre una masa molecular de unos pocos miles a más de un millón. La amilopectina también posee una elevada masa molecular (hasta 200 millones), pero a diferencia de la amilosa, está muy ramificada. Los enlaces glucosídicos que unen residuos sucesivos de glucosa en las cadenas de amilopectina son del tipo ($\alpha\rightarrow4$); los puntos de ramificación (presentes cada 24 a 30 residuos) son enlaces ($\alpha1\rightarrow6$).

El **glucógeno** es el polisacárido de reserva más importante en las células animales. Al igual que la amilopectina, el glucógeno es un polímero con subunidades de glucosa unidas por enlaces ($\alpha1\rightarrow4$) y con ramificaciones del tipo ($\alpha1\rightarrow6$), pero el glucógeno está más ramificado (de media, cada 8 a 12 residuos) y es más compacto que el almidón. El glucógeno es especialmente abundante en el hígado, donde puede llegar a representar el 7% de su peso; también se encuentra en el músculo esquelético. En los hepatocitos el glucógeno está en forma de gránulos de gran tamaño (véase la Fig. 15-26) que son agrupaciones de gránulos más pequeños, compuestos por moléculas individuales de glucógeno altamente ramificadas con una masa molecular de varios millones. Los grandes gránulos de glucógeno también contienen, íntimamente unidos, los enzimas responsables de su síntesis y degradación (véase la Fig. 15-42).

Puesto que cada rama de glucógeno termina con un azúcar no reductor, una molécula de glucógeno con n ramas tiene $n+1$ extremos no reductores, pero únicamente un extremo reductor. Cuando el glucógeno se emplea como fuente de energía, las unidades de glucosa son eliminadas de una en una de los extremos no reductores. Los enzimas degradativos que actúan solamente sobre los extremos no reductores pueden actuar simultáneamente en muchas ramas, aumentando la velocidad de conversión del polímero en monosacáridos.

¿Por qué razón la glucosa no se almacena en forma monomérica? Se ha calculado que el glucógeno almacenado en los hepatocitos equivale a una concentración de glucosa de 0,4 M. En cambio, la concentración de glucógeno, que es insoluble y contribuye poco a la osmolaridad del citosol, es de aproximadamente 0,01 μM. Si el citosol contuviera una disolución de glucosa 0,4 M, la osmolaridad de la célula sería peligrosamente elevada, lo que provocaría la entrada osmótica de agua que podría ocasionar la ruptura de la célula (véase la Fig. 2-13). Además, con una concentración intracelular de glucosa de 0,4 M y una concentración externa de aproximadamente 5 mM (concentración en la sangre de los mamíferos), la variación de energía libre para la captación celular de glucosa contra este altísimo gradiente de concentración sería excesivamente elevada.

Los **dextranos** son polisacáridos de poli-D-glucosa unida por enlaces ($\alpha1\rightarrow6$), presentes en bacterias y levaduras; todos tienen ramificaciones ($\alpha1\rightarrow3$) y algunos también ($\alpha1\rightarrow2$) o ($\alpha1\rightarrow4$). La placa dental, producida por las bacterias que crecen en la superficie de los dientes, es rica en dextranos que son adhesivos y permiten que las bacterias se unan a los dientes y entre sí. Los dextranos también constituyen una fuente de glucosa para el metabolismo bacteriano. Los dextranos sintéticos son componentes de diversos productos comerciales (por ejemplo, el Sephadex) utilizados en el fraccionamiento de proteínas por cromatografía de exclusión



Unidades de D-glucosa unidas por enlaces (β1→4)

FIGURA 7-14 Celulosa. Dos unidades de una cadena de celulosa; los residuos de D-glucosa están unidos por enlaces (β1→4). Las estructuras de silla rígida pueden presentar movimiento de rotación entre ellas.

molecular (véase la Fig. 3-17b). En estos productos los dextranos están entrecruzados químicamente para formar materiales insolubles de diferente porosidad.

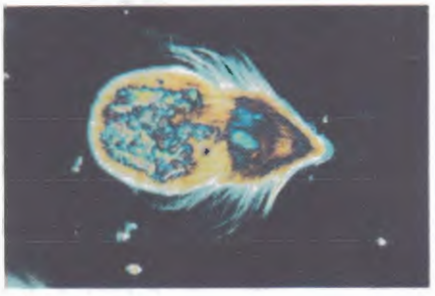
Algunos homopolisacáridos tienen función estructural

La **celulosa**, una sustancia fibrosa, resistente e insoluble en agua, se encuentra en las paredes celulares de plantas, en particular en cañas, tallos, troncos y en todos los tejidos vegetales leñosos. La celulosa constituye una gran parte de la masa de la madera, y el algodón es celulosa casi pura. Al igual que la amilosa la celulosa es una molécula lineal no ramificada formada por unas 10.000 a 15.000 unidades de D-glucosa. Pero hay una diferencia muy importante: los residuos de glucosa de la celulosa tienen configuración β **(Fig. 7-14)**, mientras que en la amilosa la glucosa se encuentra en configuración α. Los residuos de glucosa de la celulosa están unidos por enlaces glucosídicos (β1→4), a diferencia de los enlaces (α1→4) de la amilosa. Esta diferencia hace que las moléculas individuales de celulosa y amilosa se plieguen en el espacio de manera diferente dándoles estructuras y propiedades físicas muy diferentes (véase más adelante). La naturaleza dura y fibrosa de la celulosa la hace útil en productos comerciales tales como el cartón y material de aislamiento siendo, además, un componente principal del algodón y tejidos de lino. La celulosa también es el material de partida para la síntesis del celofán, rayón y lyocell.

El glucógeno y el almidón que se ingieren con la dieta son hidrolizados por α-amilasas y glucosidasas, enzimas contenidos en la saliva y en el intestino que rompen enlaces glucosídicos (α1→4) entre unidades de glucosa. La mayoría de animales vertebrados no pueden utilizar la celulosa como fuente de energía, porque carecen de un enzima capaz de hidrolizar los enlaces (β1→4). Las termitas pueden digerir fácilmente la celulosa (y, por tanto, la madera), pero ello sólo gracias a que en su tracto intestinal se aloja un microorganismo simbiótico, *Trichonympha*, que secreta celulasa, la cual hidroliza los enlaces (β1→4) **(Fig. 7-15)**. Estudios de genética molecular han demostrado que los genes que codifican los enzimas de degradación de la celulosa están presentes en los genomas de una amplia gama de animales invertebrados, incluidos artrópodos y nematodos. Hay una excepción importante en la ausencia de celulasa en vertebrados: los rumiantes tales como vacas, ovejas y cabras contienen microorganismos simbióticos en el rumen (el primero de los cuatro estómagos) que pueden hidrolizar la celulosa lo que permite que el animal degrade la celulosa de la dieta de hierbas tiernas, pero no de las plantas leñosas. La fermentación en el rumen produce acetato, propionato y β-hidroxibutirato que los animales utilizan para sintetizar los azúcares de la leche.



(a)

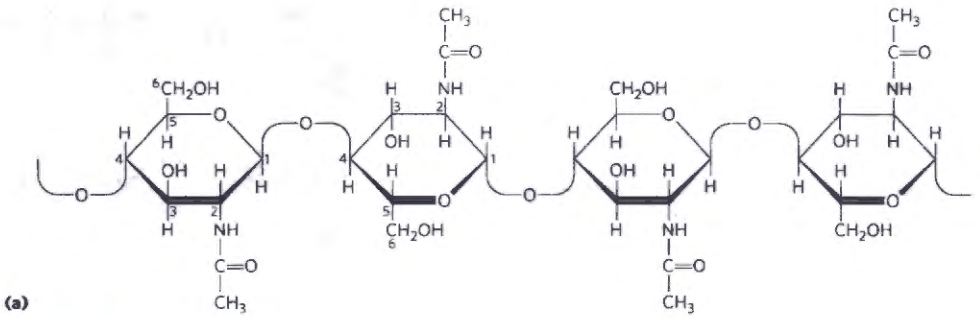


(b)

FIGURA 7-15 Degradación de la celulosa por *Trichonympha*. **(a)** La termita *Cryptotermes domesticus* corroe e ingiere partículas de madera ricas en celulosa. **(b)** *Trichonympha* un protista simbionte que vive en el intestino de las termitas produce el enzima celulasa, que rompe los enlaces glucosídicos (β1→4) de la celulosa, y hace posible el uso de la madera como fuente de azúcar metabolizable (glucosa) por el protista y la termita. Muchos invertebrados pueden digerir la celulosa pero sólo unos pocos vertebrados son capaces de utilizar la celulosa (rumiantes tales como el ganado vacuno, ovejas y cabras); los rumiantes pueden utilizar la celulosa como nutriente son porque el primero de sus cuatro compartimientos estomacales (rumen) de un rumiante aloja bacterias y protistas que secretan Grave/Science Source.]

La biomasa rica en celulosa, puede usarse como materia prima para la fermentación de glúcidos a etanol que se utiliza como aditivo de la gasolina (las hierbas altas del género *Panicum* constituen una buena cosecha de biocombustible). Cuando se convierte en etanol por fermentación la producción anual de biomasa en el planeta (debida principalmente a los organismos fotosintéticos) es el equivalente energético de casi un billón de barriles de petróleo. Debido a su uso potencial en la conversión de biomasa en bioenergía, los enzimas que degradan la celulosa, tales omo la celulasa, son sujeto de muchas investigaciones. Complejos supramoleculares, denominados celulosomas, presentes en la superficie exterior de la bacteria *Clostridium cellulolyticum*, contienen la subunidad catalítica de la celulasa junto con proteínas que retienen una o más moléculas de celulasa a la superficie bacteriana y una subunidad que fija la celulosa posicionándola en el sitio activo.

Una fracción muy importante de la biomasa fotosintética es la porción leñosa de plantas y árboles, formada por celulosa y diversos polímeros derivados de glúcidos que no son fácilmente digeribles, ni química ni biológicamente. Las ligninas, por ejemplo, constituyen alrededor del 30% de la masa de la madera. Sintetizadas a partir de precursores, entre ellos fenilalanina y glucosa, las ligninas son polímeros complejos con entrecruzamientos covalentes con la celulosa que complican la



(a)



(b)

FIGURA 7-16 Quitina. **(a)** Segmento corto de quitina, un homopolímero de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina con enlaces ($\beta 1 \rightarrow 4$). **(b)** Un coleóptero (*Pelidnota punctata*) con su exosqueleto de quitina. [Fuente: (b) Paul Whitten/ Science Source.]

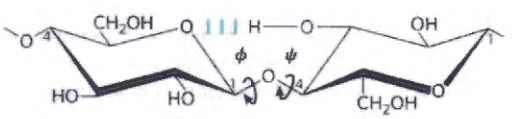
digestión de la celulosa por la celulasa. Si se tuvieran que utilizar plantas leñosas en la producción de etanol a partir de la biomasa, se habrían de encontrar métodos mejores para digerir los componentes de la madera.

La **quitina** es un homopolisacárido lineal compuesto por residuos de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces ($\beta \rightarrow \phi 4$) **(Fig. 7-16)**. La única diferencia química con respecto a la celulosa es el cambio del grupo hidroxilo en C-2 por un grupo amino acetilado. La quitina forma fibras extendidas similares a las de la celulosa y, al igual que ésta, no es digerible por los vertebrados. La quitina es el componente principal de los duros exoesqueletos del aproximadamente millón de especies de artrópodos (insectos, langostas y cangrejos, por ejemplo) y es, probablemente, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa; se calcula que cada año se producen en la biosfera alrededor de ¡mil millones de toneladas de quitina!

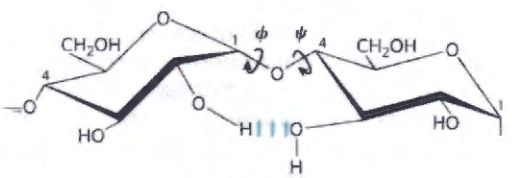
Los factores estéricos y los puentes de hidrógeno contribuyen al plegamiento de los homopolisacáridos

El plegamiento de los polisacáridos en tres dimensiones responde a los mismos principios que gobiernan la estructura de los polipéptidos: subunidades con estructura más o menos rígida dictada por enlaces covalentes forman estructuras macromoleculares tridimensionales estabilizadas por interacciones débiles intra o intermoleculares: puentes de hidrógeno, interacciones debidas al efecto hidrofóbico y de van der Waals y, en polímeros con subunidades cargadas, interacciones electrostáticas. Al tener los polisacáridos tantos grupos hidroxilo, los puentes de hidrógeno tienen una especial importancia en su estructura. El glucógeno, el almidón y la celulosa están formados por subunidades de piranosa (anillos de seis átomos) lo mismo que los oligosacáridos de las glucoproteínas y los glucolípidos que se estudiarán más adelante. Tales moléculas pueden representarse como una serie de anillos rígidos de piranosa conectados por un átomo de oxígeno que une dos átomos de carbono (el enlace glucosídico). En principio, hay libertad de rotación en torno a los enlaces C—O que unen los residuos (Fig. 7-14), pero al igual que en los polipéptidos (véanse las Figs. 4-2, 4-9), la rotación alrededor de cada enlace está limitada por los impedimentos estéricos de los sustituyentes. La estructura tridimensional de estas moléculas puede ser descrita en términos de los ángulos diedros, ϕ y ψ, del enlace glucosídico **(Fig. 7-17)**, análogos a los ángulos ϕ y ψ del enlace peptídico (véase la Fig. 4-2).

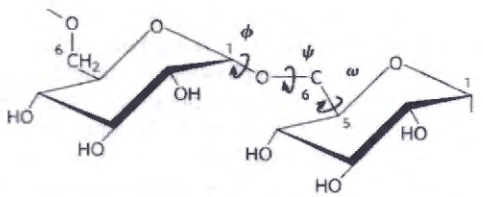
El volumen del anillo de piranosa y de sus sustituyentes, así como los efectos electrónicos del carbono anomérico, imponen restricciones a los ángulos ϕ y ψ; así, algunas conformaciones son mucho más estables



Celulosa
Repeticiones de ($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc

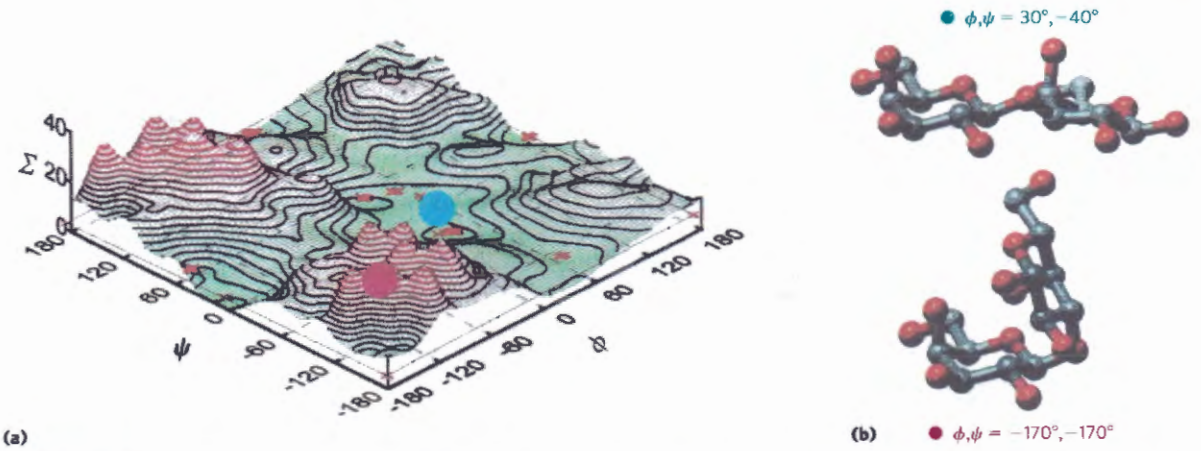


Amilosa
Repeticiones de ($\alpha 1 \rightarrow 4$)Glc



Dextrano
Repeticiones ($\alpha 1 \rightarrow 6$)Glc, (con ramas ($\alpha 1 \rightarrow 3$) no mostradas)

FIGURA 7-17 Conformación de los enlaces glucosídicos de la celulosa, amilosa y dextrano. Los polímeros se representan como anillos rígidos de piranosa unidos por enlaces glucosídicos con rotación libre en torno a estos enlaces. Obsérvese que en el dextrano también hay rotación libre en torno del enlace entre C-5 y C-6 (ángulo de torsión ω (omega)).



(a) (b)

FIGURA 7-18 Mapa de las conformaciones más favorables de oligosacáridos y polisacáridos. Los ángulos de torsión ψ y ϕ (véase la Fig. 7-17) que definen la relación espacial entre anillos adyacentes, pueden en principio tener cualquier valor entre 0° y 360°. De hecho, algunos ángulos de torsión dan lugar a conformaciones estéricamente prohibidas, mientras que otras dan conformaciones que maximizan los puentes de hidrógeno. **(a)** Cuando se representa la energía relativa (Σ) para cada valor de ϕ y ψ, con los contornos de isoenergía ("misma energía") dibujados a intervalos de 1 kcal/mol por encima del estado de mínima energía, se obtiene un mapa de las conformaciones más favorables, análogo a la representación de Ramachandran para péptidos (véanse las Figs. 4-3, 4-9). **(b)** Dos extremos energéticos para el disacárido Gal(β1—3)Gal; estos valores caen en el diagrama de energía (a) según indican los puntos rojos y azules. Los puntos rojos indican la conformación menos favorecida y la azul la más favorecida. Las conformaciones conocidas de los tres polisacáridos mostrados en la Figura 7-17 se han determinaco por cristalografía de rayos X, y todas se encuentran dentro de las regiones de menor energía del mapa. [Fuente: (a) Cortesía de H.-J. Gablus y Herbert Kaltner, Universidad de Munich, a partir de una figura proporcionada por C.-W. von der Lieth, Heidelberg.]

que otras, tal como puede verse en un mapa de energía en función de ϕ y ψ **(Fig. 7-18)**.

La estructura tridimensional más estable de las cadenas unidas por enlaces (α1ϕ4) del almidón y el glucógeno es una espiral compacta **(Fig. 7-19)**, estabilizada por puentes de hidrógeno intercatenarios. En la amilosa (sin ramificar) esta estructura es suficientemente regular para permitir su cristalización y, por lo tanto, la determinación de su estructura por difracción de rayos X. A lo largo de la cadena de amilosa, el plano promedio de cada residuo forma un ángulo de 60° con el plano promedio del residuo precedente, de manera que la hélice tiene seis residuos por vuelta. En la amilosa el orificio de la hélice tiene las dimensiones justas para acomodar yodo en forma de iones complejos (I_3^- o I_5^-) dando lugar a un complejo de color azul intenso. Esta interacción constituye el fundamento de una determinación cualitativa habitual de la amilosa.

La conformación más estable de la celulosa es aquella en que cada silla experimenta una rotación de 180° en relación con sus vecinas, lo cual genera una cadena extendida recta. Todos los grupos –OH están disponibles para formar puentes de hidrógeno con cadenas vecinas. Una red estable de puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares entre varias cadenas dispuestas paralelamente produce fibras supramoleculares estables con gran resistencia a la tracción **(Fig. 7-20)**. Esta propiedad de la celulosa la ha hecho una sustancia útil para las civilizaciones durante milenios. Muchos productos manufacturados entre los que se cuentan el papiro, papel, cartón, rayón, paneles aislantes y muchos otros materiales de utilidad son derivados de la celulosa. El contenido en agua de estos materiales es bajo porque la gran abundancia de puentes de hidrógeno intermoleculares satisface su capacidad de formación de puentes de hidrógeno.

Las paredes celulares de algas y bacterias contienen heteropolisacáridos estructurales

El componente rígido de las paredes celulares bacterianas (péptidoglucano) es un heteropolímero de unidades de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico alter-

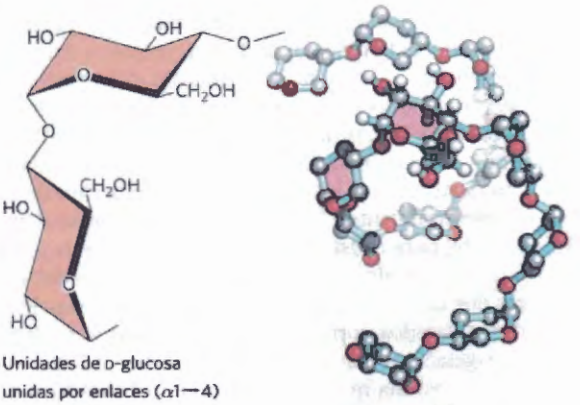


FIGURA 7-19 Estructura helicoidal del almidón (amilosa). (a) En su conformación más estable de sillas rígidas adyacentes, la cadena de polisacárido se encuentra curvada en lugar de encontrarse estirada como en la celulosa (véase la Fig. 7-14). **(b)** Modelo de un segmento de amilosa, a fin de mayor claridad, se han omitido los grupos hidroxilo de todos excepto uno de los residuos de glucosa. Compare los dos residuos sombreados en rosa con las estrucuras químicas de (a). La conformación de los enlaces (α1—4) de la amilosa, amilopectina y glucógeno hacen que estos polímeros adopten una estructura helicoidal compacta. Estas estructuras compactas son las responsables de la densidad de los gránulos de almidón o glucógeno almacenados, visibles en muchas células (véase la Fig. 20-2). [Fuente: (b) PDB ID 1C58, K. Gessler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4246, 1999.]

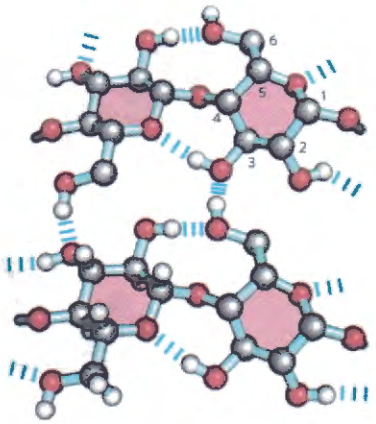
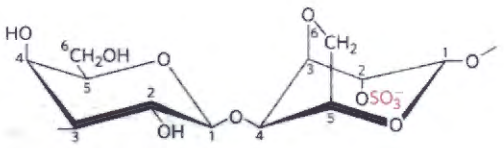


FIGURA 7-20 Cadenas de celulosa. Dibujo a escala de segmentos de dos cadenas paralelas de celulosa en el que se muestra la conformación de los residuos de D-glucosa y los entrecruzamientos por enlace de hidrógeno. En la unidad de hexosa del extremo inferior izquierdo, se muestran todos los átomos de hidrógeno; en las otras tres unidades de hexosa se han omitido, para mayor claridad, los hidrógenos unidos al carbono ya que no participan en enlaces de hidrógeno.

nadas unidas por enlaces (β1→4) (véase la Fig. 20-30). En la pared celular las cadenas lineales están dispuestas paralelamente unas a otras y entrecruzadas mediante péptidos cortos, cuya estructura concreta depende de la especie bacteriana. Los entrecruzamientos peptídicos sueldan entre sí las cadenas de polisacárido y forman una envoltura resistente (péptidoglucano) que rodea toda la célula, evitando que ésta se hinche y se lise a causa de la entrada de agua por ósmosis. El enzima lisozima destruye las bacterias mediante la hidrólisis del enlace glucosídico (β1→4) entre la *N*-acetilglucosamina y el ácido *N*-acetilmurámico (véase la Fig. 6-28). La lisozima se encuentra en las lágrimas del ojo, donde posiblemente actúa como protector frente a infecciones bacterianas. También es producida por ciertos virus bacterianos, con el fin de garantizar su liberación desde la bacteria huésped, paso esencial del ciclo de la infección vírica. La penicilina y otros antibióticos relacionados destruyen las bacterias impidiendo la síntesis de los entrecruzamientos, lo que deja la pared celular demasiado débil para resistir la lisis osmótica (véase la p. 223).

Algunas algas rojas marinas, tienen paredes celulares que contienen **agar**, una mezcla de heteropolisacáridos sulfatados, formados por D-galactosa y un derivado de L-galactosa con un enlace éter entre el C-3 y el C-6. El agar es una mezcla compleja de polisacáridos, todos con la misma estructura troncal, pero con diferentes grados de sustitución por sulfatos y piruvato. La **agarosa** (M_r ~150.000) es el componente del agar con menos grupos cargados (sulfatos, piruvatos) **(Fig. 7-21)**. La notable capacidad de la agarosa para formar geles es aprovechada en los laboratorios de bioquímica. Cuando se calienta una suspensión de agarosa en agua y a continuación se enfría, la agarosa forma una doble hélice: dos moléculas en orientación paralela se enrollan una en torno de la otra con una periodicidad helicoidal de tres residuos; la cavidad central retiene moléculas de agua. A su vez, estas estructuras se asocian entre sí para formar un gel (matriz tridimensional que retiene grandes cantidades de agua). Los geles de agarosa se usan como



Agarosa

Unidades repetitivas de 3)D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal2S(α1

FIGURA 7-21 Agarosa. La unidad repetitiva consiste en D-galactosa (β1→4) unida a 3,6-anhidro-L-galactosa (en la que un enlace éter conecta C-3 y C-6). Estas unidades están unidas por enlaces glucosídicos (α1→3) para formar un polímero de 600 a 700 residuos de longitud. Una pequeña fracción de los residuos de 3,6-anhidrogalactosa tienen un éster sulfato en C-2 (éste es el caso aquí representado). Los paréntesis abiertos en el nombre sistemático indican que las unidades repetitivas se extienden a ambos lados.

soporte inerte para la separación electroforética de ácidos nucleicos. El agar también se usa para formar una superficie adecuada para el crecimiento de colonias bacterianas. Otro uso comercial del agar es la fabricación de cápsulas que contienen vitaminas u otros fármacos; el material de agar seco se disuelve fácilmente en el estómago y es metabólicamente inerte.

Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos de la matriz extracelular

El espacio extracelular de los tejidos de animales multicelulares está ocupado por un material gelatinoso, la **matriz extracelular (ECM)**, también denominada sustancia basal, que mantiene unidas las células y forma un medio poroso para la difusión de nutrientes y oxígeno hacia las células individuales. La matriz extracelular que rodea los fibroblastos y otras células del tejido conjuntivo está compuesta por una compleja red de moléculas de heteropolisacáridos interconectadas y proteínas fibrosas tales como los colágenos fibrilares, la elastina, y la fibronectina. La membrana basal es una ECM especializada que subyace las células epiteliales; está formada por colágenos, lamininas y heteropolisacáridos. Estos heteropolisacáridos, los **glucosaminoglucanos**, son una familia de polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacárido **(Fig. 7-22)**. Se encuentran únicamente en animales y bacterias y no se encuentran en los vegetales. Uno de los dos monosacáridos es siempre la *N*-acetilglucosamina o bien la *N*-acetilgalactosamina; el otro es, en la mayor parte de casos, un ácido urónico, generalmente el ácido D-glucurónico o el L-idurónico. Algunos glucosaminoglucanos, contienen grupos sulfato esterificados. La combinación de éstos y los grupos carboxilato de los residuos de ácido urónico hace que los glucosaminoglucanos tengan una elevada densidad de carga negativa. Para minimizar las fuerzas repulsivas entre los grupos cargados próximos entre sí, estas moléculas adoptan una conformación extendida en disolución formando una hélice en forma de varilla en la que los grupos carboxilato negativos se encuentran en lados alternos de la hélice (tal como se muestra para la heparina en la Fig. 7-22). La forma de varilla extendida también proporciona una separación máxima entre los grupos sulfato cargados negativamente. Los patrones específicos de los residuos de azúcares sulfatados y no sulfatados en los glucosaminoglucanos hacen posible el reconocimien-

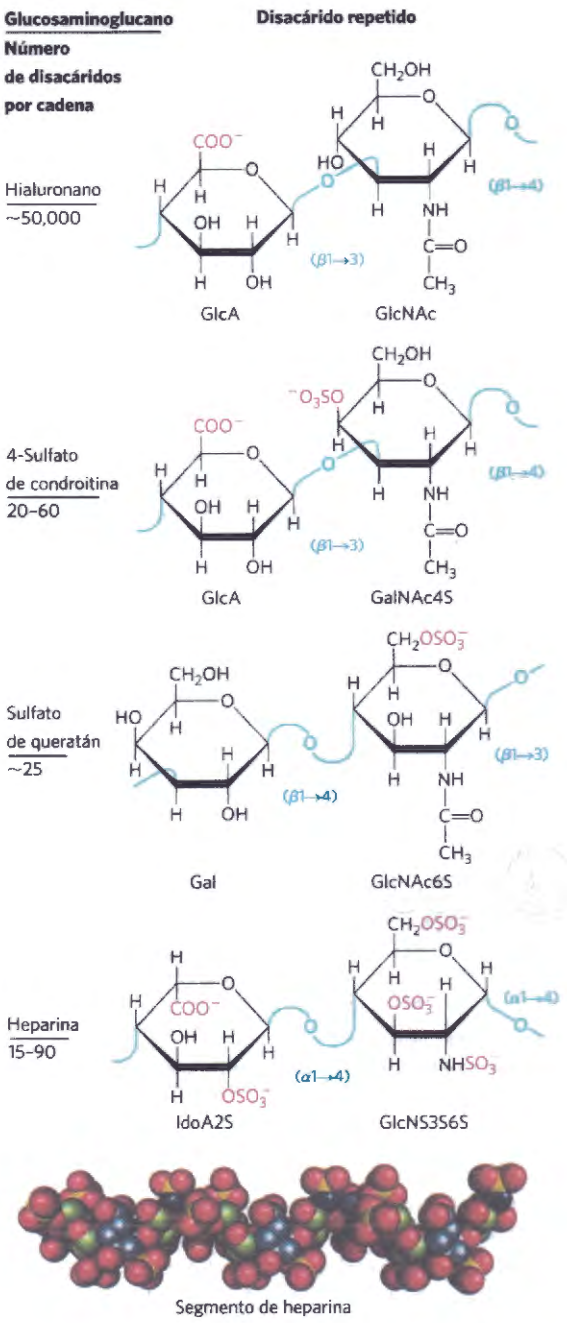
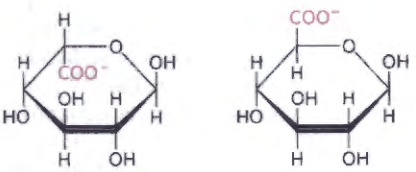


FIGURA 7-22 Unidades repetidas de algunos glucosaminoglucanos comunes de la matriz extracelular. Las moléculas son copolímeros formados por residuos alternados de ácido urónico y aminoazúcares (el sulfato de queratán constituye una excepción), con ésteres sulfato situados en diversas posiciones, excepto en el hialuronano. Los grupos carboxilato y sulfato ionizados (en rojo en las fórmulas en perspectiva) confieren a estos polímeros su elevada carga negativa característica. La heparina terapéutica contiene principalmente ácido idurónico (IdoA) y una menor proporción de ácido glucurónico (GlcA, no mostrado), se encuentra generalmente muy sulfatada y es de longitud variable. El modelo espacial muestra un segmento de heparina en su estructura en solución determinada por espectroscopia RMN (PDB ID 1HPN). Los carbonos del ácido idurónico sulfatado son azules; los de la glucosamina sulfato verdes. Los átomos de oxígeno y de azufre se muestran en sus colores estándar rojo y amarillo, respectivamente. No se muestran, para mayor claridad, los átomos de hidrógeno. El sulfato de heparán (no mostrado) es similar a la heparina, pero posee una proporción mayor de GlcA y menos grupos sulfato, dispuestos de forma menos regular. [Fuente: Modelo molecular PDB 1D 1HPN, B. Mulloy et al., *Biochem. J.* 293:849, 1993.]

to específico por una amplia variedad de ligandos proteicos que se unen electrostáticamente a estas moléculas. Los glucosaminoglucanos sulfatados se unen a proteínas extracelulares para formar proteoglucanos (Sección 7.3).

El glucosaminoglucano **hialuronano** (ácido hialurónico) contiene unidades alternadas de ácido D-glucurónico y *N*-acetilglucosamina (Fig. 7-22). Con hasta 50.000 repeticiones de la unidad disacárida básica, el hialuronano tiene una masa molecular de varios millones; forma disoluciones transparentes muy viscosas y no compresibles que sirven de lubricante en el líquido sinovial de las articulaciones y confieren consistencia gelatinosa al humor vítreo del ojo de los vertebrados (en griego, *hyalos* significa "vidrio"; el hialuronano puede tener un aspecto vítreo o translúcido). El hialuronano es también un componente esencial de la matriz extracelular de cartílagos y tendones, a los que dota de resistencia a la tensión y elasticidad, resultado de sus fuertes interacciones no covalentes con otros componentes de la matriz. La hialuronidasa, un enzima secretado por algunas bacterias patógenas, puede hidrolizar los enlaces glucosídicos del hialuronano, haciendo que los tejidos sean más susceptibles a las invasiones bacterianas. En muchas especies animales un enzima similar presente en el esperma hidroliza la capa externa de glucosaminoglucano que protege el óvulo, lo que permite la penetración de los espermatozoides.

Otros glucosaminoglucanos se diferencian del hialuronano en tres aspectos: generalmente son polímeros mucho más cortos, están unidos covalentemente a proteínas específicas (proteoglucanos) y una o las dos unidades monoméricas son diferentes de las del hialuronano. El **sulfato de condroitina** (en griego *chondros* significa "cartílago") contribuye a la resistencia a la tensión de los cartílagos, tendones, ligamentos y paredes de la aorta. El **sulfato de dermatán** (en griego *derma* significa "piel") contribuye a la flexibilidad de la piel y también está presente en los vasos sanguíneos y en las válvulas cardíacas. En este polímero, muchos de los residuos de glucuronato presentes en el sulfato de condroitina están reemplazados por por su epímero en 5, el L-iduronato (IdoA).



Los **sulfatos de queratán** (en griego *keras* significa "cuerno") no tienen ácido urónico y su contenido en sulfato es variable. Están presentes en la córnea, los cartílagos, los huesos y en diversas estructuras córneas formadas por células muertas: cuernos, pelos, pezuñas, uñas y garras. El **sulfato de heparán** (en griego *hepar* significa "hígado"; se aisló por primera vez del hígado de perro) es producido por todas las células animales y contiene ordenamientos variables de azúcares sulfatados y no sulfatados. Los segmentos sulfatados de la

TABLA 7-2 Estructura y función de algunos polisacáridos

Polímero	Tipo[a]	Unidad repetitiva[b]	Tamaño (número de unidades de monosacárido)	Funciones/significado
Almidón				Reserva energética: en plantas
Amilosa	Homo-	(α1→4)Glc, lineal	50-5.000	
Amilopectina	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 24-30 residuos	Hasta 106	
Glucógeno	Homo-	(α1→4)Glc, con ramificaciones (α1→6)Glc cada 8-12 residuos	Hasta 50.000	Reserva energética: en bacterias y células animales
Celulosa	Homo-	(β1→4)Glc	Hasta 15.000	Estructural: confiere rigidez y resistencia a las paredes de células vegetales
Quitina	Homo-	(β1→4)GlcNAc	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a los exoesqueletos de insectos, arañas y crustáceos
Dextrano	Homo-	(α1→6)Glc, con ramificaciones (α1→3)	Muy variable	Estructural: adhesivo extracelular en bacterias
Peptidoglucano	Hetero-, con péptidos unidos	4)Mur2Ac(β1→4)GlcNAc(β1	Muy grande	Estructural: confiere rigidez y resistencia a la envoltura celular bacteriana
Agarosa	Hetero	3)D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal(α1	1.000	Estructural: componente de la pared celular de las algas
Hialuronano (un glucosaminoglucano)	Hetero-, acídico	4)GlcA(β1→3)GlcNAc(β1	Hasta 100.000	Estructural: en vertebrados forma parte de la matriz extracelular de la piel y tejido conjuntivo; viscosidad y lubricación en articulaciones

[a]Cada polímero se clasifica como homopolisacárido (homo-) o como heteropolisacárido (hetero-).

[b]Las abreviaturas utilizadas para las unidades repetitivas de peptidoglucano, agarosa e hialuronano indican que el polímero contiene repeticiones de esta unidad de disacárido. Por ejemplo,en el peptidoglucano, la GlcNAc de una unidad de un disacárido está unida por un enlace (β1→4) al primer residuo de la siguiente unidad de disacárido.

cadena permiten la interacción con un gran número de proteínas, entre las que se incluyen factores de crecimiento y componentes de la ECM, así como diversos enzimas y factores presentes en el plasma. La heparina es una forma intracelular muy sulfatada del sulfato de heparán producido principalmente por los mastocitos (un tipo de leucocito o célula inmune). No está claro aún su papel fisiológico pero la heparina purificada se utiliza como agente terapéutico para inhibir la coagulación de la sangre gracias a su capacidad de unirse al inhibidor de proteasa antitrombina (véase la Fig. 7-27).

La Tabla 7-2 resume la composición, propiedades, funciones y localización de los polisacáridos descritos en la sección 7.2.

RESUMEN 7.2 Polisacáridos

- Los polisacáridos (glucanos) sirven de reserva energética y de componentes estructurales en las paredes celulares y en la matriz extracelular.
- Los homopolisacáridos almidón y glucógeno son combustibles de reserva en las células vegetales, animales y bacterianas. Consisten en D-glucosa con enlaces (α1→4) y los dos están ramificados.
- Los homopolisacáridos celulosa, quitina y dextrano tienen papeles estructurales. La celulosa está formada por residuos de D-glucosa unidos por enlaces (β1→4) y confiere resistencia y rigidez a las paredes celulares de las plantas. La quitina, un polímero de *N*-acetilglucosamina unida por enlaces (β1→4) confiere resistencia a los exoesqueletos de los artrópodos. El dextrano forma una capa adhesiva en el exterior de algunas bacterias.
- Los homopolisacáridos se pliegan en tres dimensiones. La forma de silla del anillo de la piranosa es esencialmente rígida, por lo que la conformación de los polímeros está determinada por la rotación en torno a los enlaces entre el anillo y el átomo de oxígeno en el enlace glucosídico. El almidón y el glucógeno forman estructuras helicoidales con puentes de hidrógeno intracatenarios; la celulosa y la quitina forman cadenas largas y estiradas que interaccionan con cadenas vecinas.
- Las paredes celulares de las bacterias y las algas están reforzadas por heteropolisacáridos (peptidogluca-

no en las bacterias, agar en las algas rojas). El disacárido repetido en los peptidoglucanos es GlcNAc(β1→4)Mur2Ac; en el agar es D-Gal(β1→4)3,6-anhidro-L-Gal.

■ Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos extracelulares en los que una de las dos unidades de monosacárido es un ácido urónico (el sulfato de queratán es una excepción) y la otra un aminoazúcar *N*-acetilado. Los ésteres sulfato de algunos de los grupos hidroxilo y de grupos amino de algunos residuos de glucosamina en la heparina y en el sulfato de heparán confieren a estos polímeros una elevada densidad de carga negativa, que fuerza la adopción de estructuras extendidas. Estos polímeros (hialuronano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y sulfato de queratán) son responsables de la viscosidad, adhesividad y resistencia a la tensión de la matriz extracelular.

7.3 Glucoconjugados: proteoglucanos, glucoproteínas y glucoesfingolípidos

Además de sus importantes funciones como combustibles de reserva (almidón, glucógeno, dextrano) y como materiales estructurales (celulosa, quitina, peptidoglucanos), los polisacáridos y los oligosacáridos son transportadores de información. Algunos proporcionan comunicación entre células y su entorno extracelular; otros etiquetan proteínas para su transporte y localización en orgánulos específicos o para su destrucción cuando la proteína está malformada o se vuelve superflua; otros, finalmente, actúan como sitios de reconocimiento de moléculas de señalización extracelulares (factores de crecimiento, por ejemplo) o parásitos extracelulares (bacterias o virus). En casi todas las células eucarióticas, cadenas de oligosacáridos específicos unidas a los componentes de la membrana plasmática forman una capa glucídica (el glucocálix) de varios nanómetros de espesor que constituye una superficie rica en información que la célula expone a su entorno. Estos polisacáridos juegan un papel central en el reconocimiento y la adhesión célula-célula, en la migración celular durante el desarrollo, en la coagulación sanguínea, en la respuesta inmunitaria, en la cicatrización de las heridas, y en otros procesos celulares. En la mayor parte de estos casos, el glúcido portador de la información está unido covalentemente a una proteína o a un lípido para formar un **glucoconjugado**, que es la molécula biológicamente activa **(Fig. 7-23)**.

Los **proteoglucanos** son macromoléculas de la superficie celular o de la ECM en las que una o más cadenas de glucosaminoglucano sulfatado están unidas covalentemente a una proteína de membrana o a una proteína de secreción. La cadena de glucosaminoglucano puede unirse a proteínas extracelulares mediante interacciones electrostáticas entre la proteína y los grupos del proteoglucano cargados negativamente. Los proteoglucanos son componentes principales de todas las matrices extracelulares.

Las **glucoproteínas** tienen uno o varios oligosacáridos de diversa complejidad unidos covalentemente a una proteína. Se encuentran normalmente en el lado externo de la membrana plasmática (formando parte del glucocálix), en la ECM y en la sangre. Dentro de las células, se encuentran en orgánulos específicos tales

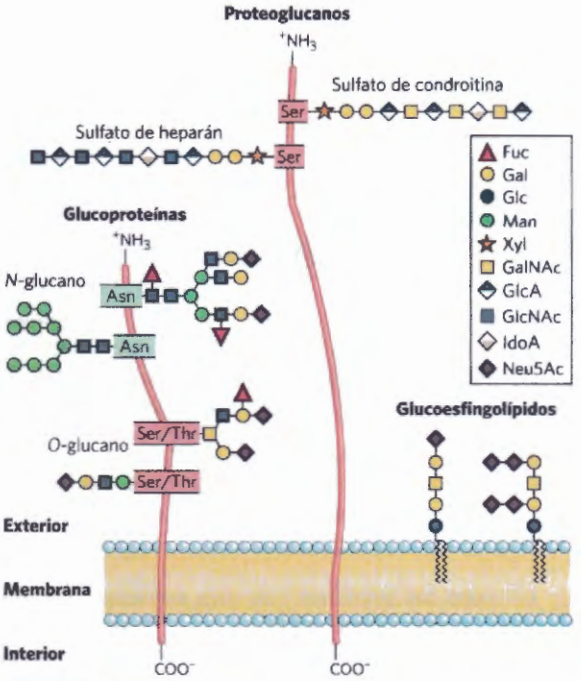


FIGURA 7-23 Glucoconjugados En el texto se describen las estructuras de algunos proteoglucanos, glucoproteínas y glucoesfingolípidos típicos.

como los complejos de Golgi, los gránulos de secreción y los lisosomas. Las porciones oligosacáridas de las glucoproteínas son muy heterogéneas y, al igual que los glucosaminoglucanos, son ricas en información, formando sitios altamente específicos para el reconocimiento y la unión de elevada afinidad de las proteínas ligadoras de glúcidos llamadas lectinas. Algunas proteínas citosólicas y nucleares también pueden estar glucosiladas.

Los **glucoesfingolípidos** son componentes de la membrana plasmátoica en los que los grupos hidrofílicos de cabeza son oligosacáridos. Del mismo modo que las glucoproteínas, los oligosacáridos actúan como sitios específicos para el reconocimiento por las lectinas. Las neuronas contien muchos glucoesfingolípidos que colaboran en la conducción nerviosa y en la formación de mielina. Los glucoesfingolípidos también intervienen en la transducción de señales en las células. Los esfingolípidos se discuten más detalladamente en los Capítulos 10 y 11.

Los proteoglucanos son macromoléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular que contienen glucosaminoglucanos

Las células de mamífero pueden sintetizar al menos 40 tipos de proteoglucanos. Estas moléculas actúan de organizadores titulares e influyen en diversas actividades celulares tales como la activación y adhesión del factor de crecimiento. La unidad básica de los proteoglucanos consiste en una "proteína núcleo" a la que se unen covalentemente uno o varios glucosaminoglucanos. La unión es a través de un residuo de Ser, al que se une el glucosaminoglucano mediante un puente tetrasacárido **(Fig. 7-24)**. El residuo de Ser se encuentra generalmente en la secuencia –Ser-Gly-X-Gly- (en donde X es cualquier residuo aminoácido); sin embargo,

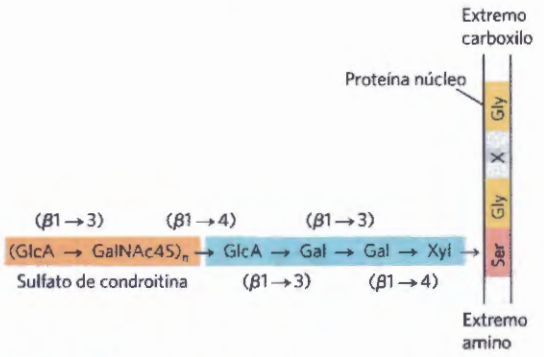


FIGURA 7-24 Estructura del proteoglucano, en la que se muestra el puente trisacárido. Un típico tetrasacárido de unión (en azul) conecta un glucosaminoglucano -en este caso 4-sulfato de condroitina (en naranja)- con un residuo de Ser situado en la proteína núcleo. El residuo de xilosa situado en el extremo reductor del conector está unido por su carbono anomérico al grupo hidroxilo del residuo de Ser.

no todas las proteínas con esta secuencia tienen un glucosaminoglucano unido.

Muchos proteoglucanos se secretan a la ECM, pero algunos son proteínas integrales de membrana (véase la Fig. 11-6). Por ejemplo, la ECM (lámina basal), que separa grupos organizados de células de otros grupos, contiene una familia de proteínas núcleo (M_r 20.000 a 40.000), cada una con varias cadenas de sulfato de heparán unidas covalentemente. Existen dos familias principales de proteoglucanos de sulfato de heparán de membrana. Los **sindecanos** tienen un único dominio transmembrana y un dominio extracelular con tres a cinco cadenas de sulfato de heparán y, en algunos casos, de sulfato de condroitina **(Fig. 7-25a)**. Los **glupicanos**, están unidos a la membrana por un anclaje lipídico, un derivado del lípido de membrana fosfatidil inositol (véase la Fig. 11-13). Tanto los sindecanos como los glupicanos pueden ser vertidos al espacio extracelular. Una proteasa de la ECM que corta en un punto cercano a la superficie de la membrana libera ectodominios de sindecán (dominios al exterior de la membrana plasmática) mientras que una fosfolipasa que rompe la conexión al lípido de membrana libera los glupicanos. Estos mecanismos proporcionan a la célula una manera de cambiar rápidamente sus características de superficie. El vertido está muy regulado y se activa en las células en proliferación, tales como las células cancerosas. El vertido der proteoglucanos interviene en el reconocimiento y en la adhesión intercelulares, así como en la proliferación y diferenciación celular. También existe un gran número de proteoglucanos con sulfatos de condroitina y de dermatán, algunos de los cuales son entidades ligadas a la membrana mientras que otros son productos secretados a la ECM.

Las cadenas de glucosaminoglucanos pueden unirse a un gran número de ligandos extracelulares y de esta manera modulan la interacción de los ligandos con sus receptores específicos de la superficie celular. El examen detallado del sulfato de heparán ha demostrado que la estructura del dominio no es casual; algunos dominios (normalmente de una longitud de trea a ocho unidades disacáridas de longitud) difieren de los dominios vecinos en secuencia y en capacidad para interaccionar con proteínas específicas. Los dominios altamente sulfatados (dominios NS) alternan con dominios que contienen residuos de GlcNAc y GlcA no modificados (dominios *N*-acetilados o NA) (Fig. 7-25b). El patrón exacto de sulfatación en los dominios NS depende de cada proteoglucano; dado el número de modificaciones posibles del dímero GlcNAc-IdoA (ácido idurónico), son posibles, al menos, 32 unidades distintas de disacárido. Además, la misma proteína núcleo puede mostrar diferentes estructuras de sulfato de heparán cuando se sintetiza en diferentes tipos celulares.

Las moléculas de sulfato de heparán con dominios NS organizados de forma precisa propiedades se unen de manera específica a proteínas extracelulares y moléculas de señalización modificando sus propiedades. El cambio

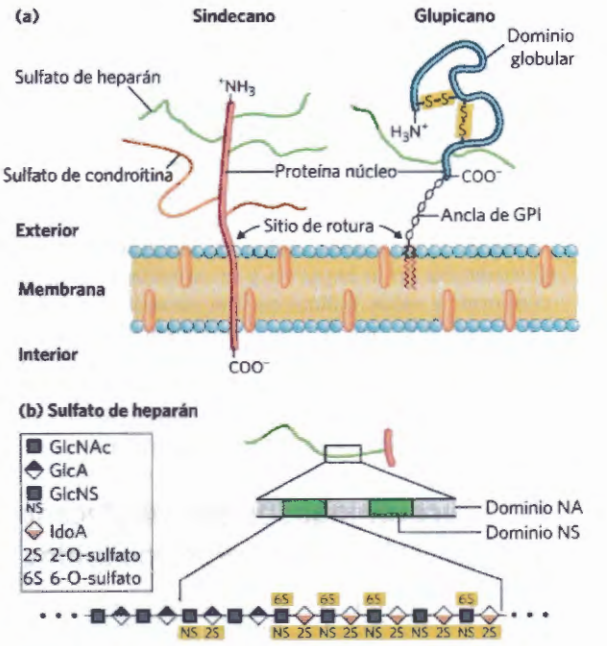


FIGURA 7-25 Dos familias de proteoglucanos de membrana. (a) Este esquema muestra un sindecano, y un glupicano de la membrana plasmática. Los sindecanos se mantienen unidos a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas entre una secuencia de residuos aminoácidos apolares y lípidos de la membrana plasmática; pueden liberarse mediante un corte proteolítico sencillo cerca de la superficie de la membrana. En un sindecano típico el dominio amino-terminal del lado extracelular de la membrana se une covalentemente (por tetrasacáridos conectores tales como los de la Fig. 7-24) a tres cadenas de sulfato de heparán y dos cadenas de sulfato de condroitina. Los glupicanos se mantienen en la membrana mediante un lípido de membrana unido covalentemente (ancla GPI; véase la Fig. 11-13) y se suelta si el enlace entre la porción lípido del ancla GPI (fosfatidilinositol) y el oligosacárido unido a la proteína se corta con una fosfolipasa. Todos los glupicanos tienen 14 residuos de Cys conservados, los cuales forman enlaces disulfuro para estabilizar la porción proteica y dos o tres cadenas de glucosaminoglucano unidas cerca del extremo carboxilo, cerca de la superficie de la membrana. **(b)** A lo largo de una cadena de sulfato de heparán, las regiones ricas en azúcares sulfatados, los dominios NS (verde), alternan con regiones de residuos de GlcNAc y GlcA normalmente no modificados, los dominios NA (gris). Uno de los dominios NS se muestra con más detalle, para poner de manifiesto una alta densidad de residuos modificados: GlcNS, (*N*-sulfoglucosamina) con un éster sulfato en C-6, y GlcA e IdoA, con un éster sulfato en C-2. El patrón exacto de sulfatación del dominio NS difiere entre los proteoglucanos. [Fuentes: (a) Información de U. Hacker et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:530, 2005. (b) Información de J. Turnbull et al., *Trends Cell Biol.* 11:75, 2001.]

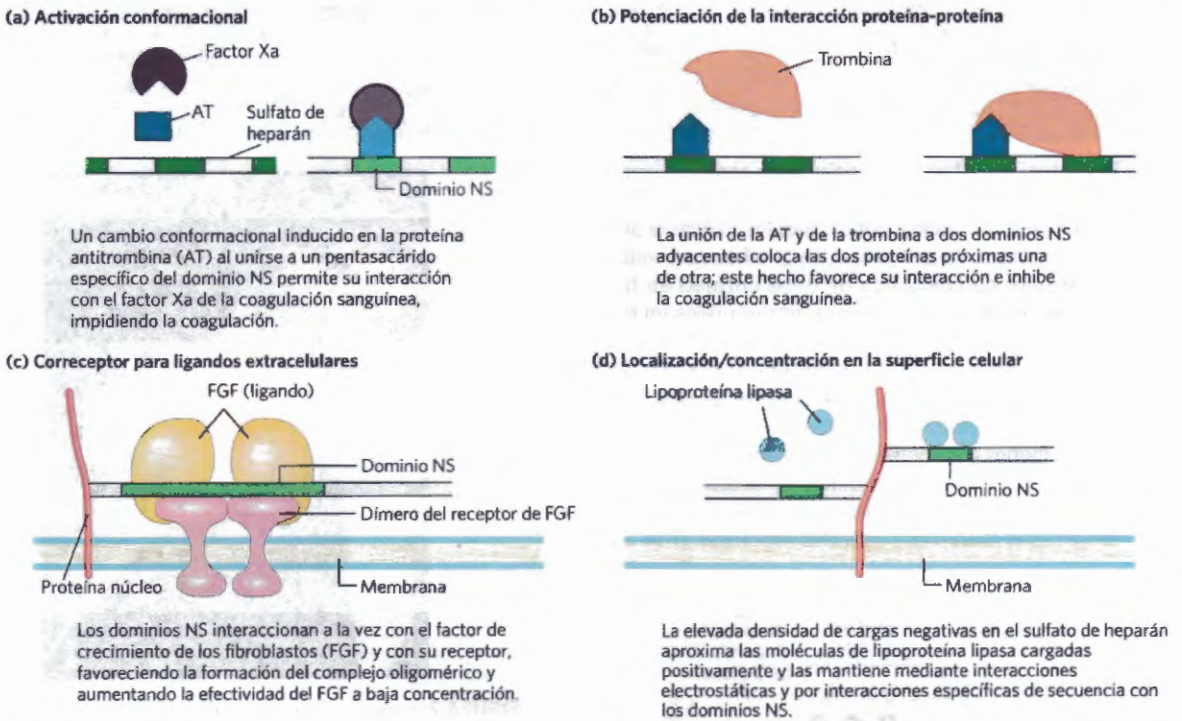


FIGURA 7-26 Cuatro tipos de interacciones proteicas con los dominios NS del sulfato de heparán. [Fuente: Información de J. Turnbull et al., *Trends Cell Biol.* 11:75, 2001.]

en la actividad puede ser debido a un cambio conformacional en la proteína inducido por la unión **(Fig. 7-26a)** o a la capacidad de dominios adyacentes de sulfato de heparán de unirse a dos proteínas diferentes y situarlas muy próximas de manera que se ven favorecidas las interacciones proteína-proteína (Fig. 7-26b). Un tercer mecanismo general de acción consiste en la unión de moléculas de señalización extracelulares (por ejemplo, factores de crecimiento) al sulfato de heparán, con el consecuente aumento de la concentración local y una más fácil interacción con los receptores del factor de crecimiento en la superficie celular; en este caso el sulfato de heparán actúa de correceptor (Fig. 7-26c). Por ejemplo, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), una señal proteica extracelular que estimula la división celular, se une primeramente a la porción de sulfato de heparán de moléculas de sindecán de la membrana plasmática de las células diana. El sindecán presenta el FGF a los receptores de FGF de la membrana plasmática, y sólo entonces el FGF puede interaccionar eficazmente con sus receptores para desencadenar la división celular. Finalmente, en otro tipo de mecanismo, los dominios NS interaccionan, electrostáticamente y de otros modos, con una gran variedad de moléculas solubles del exterior de la célula, manteniendo una elevada concentración local en la superficie celular (Fig. 7-26d).

La proteasa trombina, esencial para la coagulación de la sangre (véase la Fig. 6-41), es inhibida por otra proteína sanguínea, la antitrombina, que impide la coagulación prematura de la sangre. La antitrombina no se une o inhibe la trombina en ausencia de sulfato de heparán. En presencia de sulfato de heparán o heparina, la afinidad de unión de la trombina por la antitrombina aumenta 2.000 veces con lo que la trombina está fuertemente

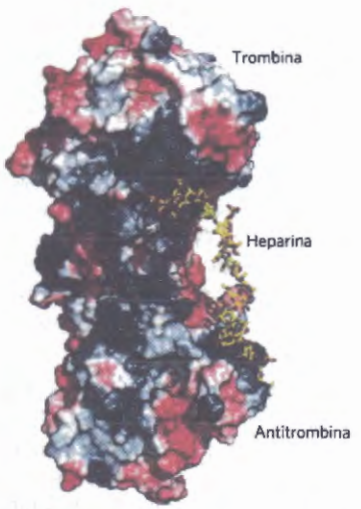


FIGURA 7-27 Base molecular del incremento de la unión entre trombina y antitrombina debido al sulfato de heparán. En esta estructura cristalina de trombina, antitrombina y un polímero de 16 residuos tipo sulfato de heparán, cristalizados conjuntamente, los sitios de unión del sulfato de heparán en ambas proteínas son ricos en residuos Arg y Lys. Estas regiones cargadas positivamente, mostradas en azul, permiten una unión electrostática fuerte con múltiples sulfatos y carboxilatos del sulfato de heparán cargados negativamente. En consecuencia, la afinidad de la antitrombina hacia la trombina es tres órdenes de magnitud mayor en presencia del sulfato de heparán que en su ausencia. Regiones de la trombina y de la antitrombina ricas en residuos cargados negativamente se muestran en rojo en esta representación electrostática de las dos proteínas. [Fuente: PDB ID 1TB6. W. Li et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:857, 2004.]

RECUADRO 7-3 MEDICINA Defectos en la síntesis o degradación de glucosaminoglucanos pueden producir enfermedades humanas graves

La síntesis de glucosaminoglucanos requiere enzimas que activan azúcares monoméricos, los transportan a través de membranas, condensan los azúcares activados en forma de polisacáridos y adicionan sulfatos. Mutaciones en cualquiera de estos enzimas en humanos pueden provocar defectos estructurales en el glucosaminoglucano (o en los proteoglucanos formados a partir del mismo). El resultado puede ser cualquiera dentro de una variedad de defectos en la señalización celular, proliferación celular, morfogénesis tisular o interacciones con factores de crecimiento (Fig. 1). Por ejemplo, no poder extender la unidad disacárida GlNAc-GlcA produce una anormalidad en la que se desarrollan múltiples y grandes espolones (Fig. 2).

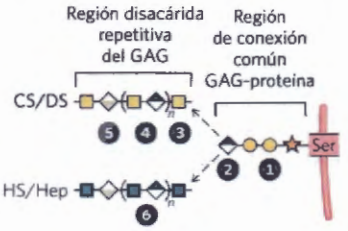


FIGURA 1 Segmento de un proteoglucano que muestra la estructura normal de los glucosaminoglucanos (GAG) sulfato de condroitina o sujlfato de dermatán (CS/DS)(parte superior) y sulfato de heparán o heparina (HS/Hep) (parte inferior) unidos a través de la región conectora a un residuo Ser en la proteína núcleo. Cuando un enzima biosintético específico está ausente debido a una mutación, los elementos numerados no pueden añadirse al oligosacárido en crecimiento por lo que el producto queda truncado. La presencia del GAG disfuncional da lugar a diversos tipos de enfermedades humanas según el sitio de bloqueo: ❶ síndrome de Ehlers-Danlos, de tipo progeroide con articulaciones hiper extensibles, piel frágil y envejecimiento prenmaturo; ❷ baja estatura o frecuentes dislocaciones de las articulaciones; ❸ neuropatía (lesión nerviosa); ❹ defectos en el esqueleto; ❺ enfermedad bipolar o hernia diafragmática, y ❻ deformaciones óseas en forma de grandes espolones.

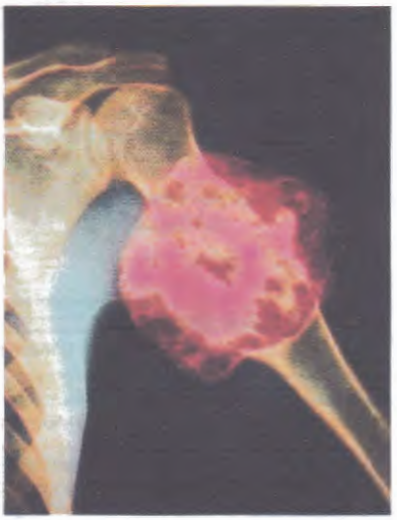


FIGURA 2 Deformación ósea característica de la exostosis hereditaria múltiple, enfermedad debida a una incapacidad genética de añadir el disacárido GlNAc-GlcA a la cadena en crecimiento del sulfato de heparán o de la heparina (véase ❻ en la Fig. 1). El crecimiento extra del hueso se ha coloreado artificialmente en rojo en esta radiografía del húmero (hueso superior del brazo) [Fuente: CNRI/Science Phto Library/Science Source.]

Cuando el defecto tiene lugar en enzimas degradativos, la acumulación de glucosaminoglucanos degradados de forma incompleta puede causar enfermedades que van desde moderadas, como el síndrome de Scheie, con rigidez de las articulaciones pero inteligencia y duración de vida normales, hasta graves, como en el síndrome de Hurler, en el que aparecen órganos internos hipertrofiados, enfermedad cardíaca, enanismo, retraso mental y muerte temprana. Los glucosaminoglucanos se denominaban anteriormente mucopolisacáridos por lo que las enfermedades causadas por defectos genéticos de su degradación se denominan a menudo polisacaridosis.

inhibida. Cuando trombina y antitrombina se cristalizan en presencia de un corto segmento (16 residuos) de sulfato de heparán, este sulfato de heparán falso, cargado negativamente, une regiones de las dos proteínas cargadas positivamente provocando un cambio alostérico que inhibe la actividad proteasa de la trombina **(Fig. 7-27)**. Los sitios de unión de sulfato de heparán y de heparina en ambas proteínas son ricos en residuos Arg y Lys; las cargas positivas de los aminoácidos interaccionan electrostáticamente con los sulfatos de los glucosaminoglucanos. La antitrombina también inhibe otras dos proteínas de la coagulación sanguínea (factores IXa y Xa) en un proceso dependiente del sulfato de heparán.

La importancia de los dominios sulfatados sintetizados de manera correcta en el sulfato de heparán se pone de manifiesto en ratones mutantes genosuprimidos ("knockout") que carecen del enzima que introduce sulfato en el hidroxilo C-2 del iduronato (IdoA). Estos animales nacen sin riñones y con graves anomalías en el desarrollo del esqueleto y los ojos. Otros estudios demuestran que los proteoglucanos de membrana son importantes en la eliminación de lipoproteínas en el hígado. Finalmente, existen cada vez más pruebas de que la ruta seguida en el desarrollo de los axones en el sistema nervioso, y por tanto la formación de circuitos, depende de proteoglucanos que contienen sulfatos de heparán y sulfato de condroitina, los cuales proporcionan pistas para el rápido crecimiento de los axones.

La importancia funcional de los proteoglucanos y de los glucosaminoglucanos asociados a los mismos puede verse también en los efectos de mutaciones que bloquean la síntesis o degradación de estos polímeros en humanos (Recuadro 7-3).

Algunos proteoglucanos pueden formar **agregados de proteoglucano**, enormes agrupaciones supramoleculares de muchas proteínas núcleo unidas todas ellas a

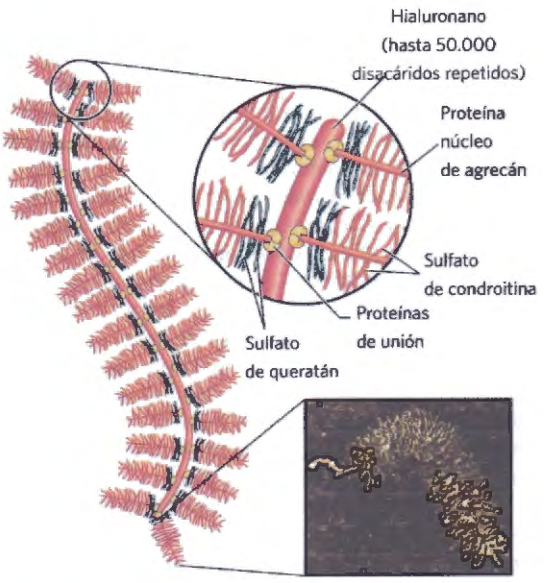


FIGURA 7-28 Agregado de proteoglucano de la matriz extracelular. Dibujo esquemático de un proteoglucano con muchas moléculas de agrecán. Una molécula de hialuronano de gran longitud se asocia de manera no covalente con unas 100 moléculas de la proteína núcleo agrecán. Cada molécula de agrecán contiene muchas moléculas de sulfato de condroitina y sulfato de queratán unidas covalentemente. Las proteínas de unión situadas en el punto de unión entre cada proteína núcleo y la espina central de hialuronano intervienen en la interacción proteína núcleo-hialuronano. La micrografía muestra una molécula individual de agrecán vista con el microscopio de fuerza atómica (véase el Recuadro 19-2). [Fuente: Micrografía cortesía de Laurel Ng. Reproducida con permiso de Ng, J., Grodinsky, A, Patwari, P., Sandy, J, Plaas, A, H. K y Ortiz, C. (2003). Las moléculas individuales del agrecán de cartílago y sus glucosaminoglucanos constituyentes se han visualizado mediante microscopia de fuerza atómica. *J. Struct. Biol.* 143:242-257, Fig. 7ª izquierda. © Elsevier.]

una única molécula de hialuronano. La proteína núcleo del agrecán (M_r ~250.000) tiene múltiples cadenas de sulfato de condroitina y de sulfato de queratán unidas a residuos de Ser de la proteína núcleo a través de trisacáridos de unión, para dar un monómero de agrecán de M_r ~2 x 10^6. Cuando un centenar o más de estas proteínas núcleo "decoradas" se unen a una única molécula de hialuronano extendida **(Fig. 7-28)**, el agregado de proteoglucano resultante (M_r >2 x 10^8) y su agua de hidratación asociada ocupan un volumen aproximadamente igual ¡al de una célula bacteriana! El agrecán interacciona fuertemente con el colágeno de la matriz extracelular del cartílago, contribuyendo a su desarrollo, a la resistencia a la tensión y a la elasticidad de este tejido conjuntivo.

Las proteínas fibrosas de la matriz tales como el colágeno, la elastina y la fibronectina se encuentran entrelazadas con estos enormes proteoglucanos extracelulares, formando una malla entrecruzada que proporciona resistencia y elasticidad al conjunto de la ECM. Algunas de estas proteínas son multiadhesivas, al tener cada molécula de proteína varios sitios de unión para varias moléculas de la matriz. La fibronectina, por ejemplo, tiene dominios distintos que unen la fibrina, el sulfato de heparán, el colágeno y una familia de proteínas de la membrana plasmática denominadas integrinas, que intervienen en la señalización entre el interior

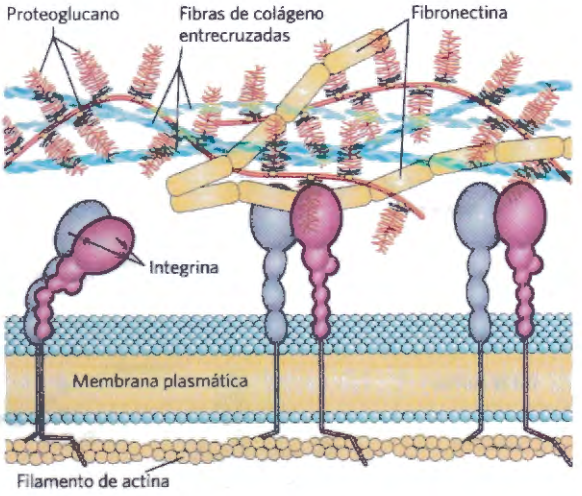


FIGURA 7-29 Interacciones entre las células y la matriz extracelular. En la asociación entre las células y los proteoglucanos de la matriz extracelular participan una proteína de membrana (integrina) y una proteína extracelular (fibronectina en este ejemplo), que posee sitios de unión tanto para las integrinas como para los proteoglucanos. Obsérvese la estrecha asociación de las fibras de colágeno con la fibronectina y el proteoglucano.

de la célula y la ECM. La imagen global que emerge de las interacciones célula-matriz **(Fig. 7-29)** muestra una serie de interacciones entre moléculas celulares y extracelulares. Estas interacciones no sólo sirven para anclar las células a la ECM, que proporciona la fuerza y elasticidad de la piel y de las articulaciones, sino también para proporcionar vías que dirigen la migración de las células en el tejido en desarrollo y para transmitir información en ambas direcciones a través de la membrana plasmática.

Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente

Las glucoproteínas son conjugados de proteína y glúcidos en los que los glucanos son menores, están ramificados y son, estructuralmente, más variados que los glucosaminoglucanos de los proteoglucanos. El glúcido se une por su carbono anomérico mediante un enlace glucosídico con el –OH de un residuo de Ser o Thr (*O*-unidos) o mediante un enlace *N*-glucosilo con el nitrógeno amídico de un residuo de Asn (*N*-unidos) **(Fig. 7-30)**. Algunas glucoproteínas tienen una sola cadena de oligosacárido, pero muchas tienen más de una; el glúcido puede representar del 1% al 70% o más de la masa de la glucoproteína. Alrededor de la mitad de todas las proteínas de mamíferos están glucosiladas y cerca de un 1% de todos los genes de mamíferos codifican enzimas que intervienen en la síntesis y unión de estas cadenas oligosacáridas. Los oligosacáridos *N*-unidos se encuentran generalmente en la secuencia consenso N-{P}-[ST] si bien no se utilizan todos los sitios potenciales. (Véase el Recuadro 3-2 sobre las convenciones en la representación de las secuencias consenso). Parece que no hay secuencias consenso específicas para los oligosacáridos *O*-unidos, aunque regiones portadoras de cadenas *O*-unidas tienden a ser ricas en residuos Gly, Val y Pro.

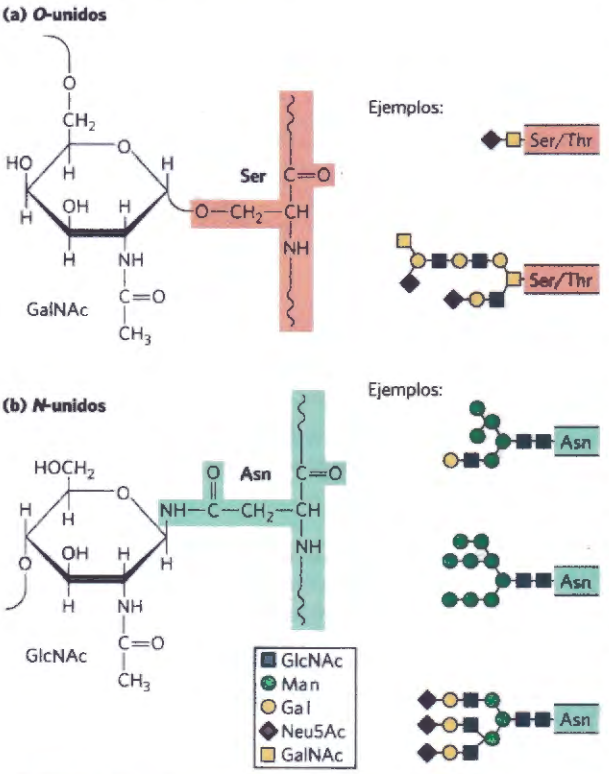


FIGURA 7-30 Unión de oligosacáridos a glucoproteínas. **(a)** Los oligosacáridos *O*-unidos tienen un enlace glucosídico con el grupo hidroxilo de residuos de Ser o Thr (sombreado en rosa), que aquí se ilustra con el GalNAc como azúcar en el extremo reductor del oligosacárido. Se muestra una cadena simple y una compleja. **(b)** Los oligosacáridos *N*-unidos tienen un enlace *N*-glucosídico con el nitrógeno amídico de la Asn (verde), que aquí se ilustra con el GlcNAc como azúcar terminal. Se muestran tres cadenas de oligosacáridos comunes de las glucoproteínas que están *N*-unidas. Una descripción completa de la estructura del oligosacárido requiere la especificación de la posición y estereoquímica (α o β) de cada enlace glucosídico.

Hay una clase de glucoproteínas, que se encuentran en el citoplasma y en el núcleo, que presentan la singularidad de que las posiciones glucosiladas de la proteína son sólo portadoras de residuos sencillos de *N*-acetilglucosamina, en enlace *O*-glucosídico con el grupo hidroxilo de cadenas laterales de Ser. Esta modificación es reversible y, a menudo, tiene lugar sobre los mismos residuos de Ser que se fosforilan en algún paso de la actividad de la proteína. Las dos modificaciones son mutuamente excluyentes y este tipo de glucosilación es importante en la regulación de la actividad proteica. En el Capítulo 12 se analiza extensamente la fosforilación de proteínas

Tal como veremos en el Capítulo 11, la superficie externa de la membrana plasmática tiene muchas glucoproteínas de membrana con una serie de oligosacáridos de complejidad variable unidos covalentemente. Las **mucinas** son glucoproteínas de secreción o de membrana que pueden contener grandes cantidades de cadenas de oligosacárido *O*-unidas. Las mucinas se encuentran en la mayoría de secreciones; confieren al moco su tacto resbaladizo característico.

La **glucómica** es la caracterización sistemática de todos los componentes glucídicos de una célula o tejido dados, incluidos lo que se encuentran ligados a proteínas y a lípidos. En el caso de las glucoproteínas, esto también significa la determinación de qué proteínas están glucosiladas y en qué parte de la secuencia de aminoácidos está unido cada oligosacárido. Éste es un desafío de gran magnitud, pero que vale la pena debido a los conocimientos potenciales que ofrece sobre los patrones normales de glucosilación y sobre las vías en los que están alterados durante el desarrollo, en las enfermedades genéticas o en el cáncer. Los métodos actuales para caracterizar el complemento glucídico completo de las células dependen, fundamentalmente, de una aplicación sofisticada de la espectroscopia de masas (véase la Fig. 7-39).

Se conocen las estrucuras de muchos oligosacáridos *O*-unidos y *N*-unidos de un buen número de glucoproteínas; las Figuras 7-23 y 7-30 muestran unos cuantos ejemplos típicos. En el Capítulo 27 se estudian los mecanismos por los que proteínas específicas adquieren porciones oligosacáridas específicas.

Muchas de las proteínas secretadas por las células eucarióticas son glucoproteínas, entre ellas la mayoría de las proteínas de la sangre. Por ejemplo, las inmunoglobulinas (anticuerpos) y ciertas hormonas, tales como la hormona estimuladora del folículo, la hormona luteinizante y la hormona estimuladora del tiroides son glucoproteínas. Muchas proteínas de la leche, incluida al principal proteína del suero láctico, la α-lactalbúmina, y algunas de las proteínas secretadas por el páncreas (por ejemplo, la ribonucleasa) están glucosiladas, como también lo están la mayoría de las proteínas contenidas en los lisosomas.

Lentamente se empiezan a conocer las ventajas biológicas derivadas de añadir oligosacáridos a las proteínas. Las agrupaciones de glúcidos muy hidrofílicos modifican la polaridad y la solubilidad de las proteínas a las que están conjugados. Las cadenas de oligosacáridos unidas a las proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) y elaboradas en el complejo de Golgi, sirven de etiqueta de destino y también como control de calidad de la proteína, ya que dirigen las proteínas mal plegadas hacia su degradación (véase las Figs. 27-41, 27-42). Cuando numerosas cadenas de oligosacáridos cargadas negativamente están agrupadas en una región de la proteína, la repulsión entre las cargas favorece la formación de estructuras en forma de varilla rígida en esta región. El volumen y las cargas negativas de las cadenas de oligosacárido también protegen algunas proteínas de los ataques por enzimas proteolíticos. Además de estos efectos físicos globales sobre la estructura de las proteínas, las cadenas de oligosacárido también producen efectos biológicos más específicos en las glucoproteínas (Sección 7.4). La importancia de la glucosilación normal de las proteínas está clara debido al descubrimiento de que al menos 40 enfermedades genéticas diferentes en humanos debidas a la glucosilación, producen desarrollo físico o mental defectuoso grave; algunas de estas enfermedades son mortales.

Los glucolípidos y los lipopolisáridos son componentes de membrana

Las glucoproteínas no son los únicos componentes celulares que contienen cadenas complejas de oligosacáridos; también algunos lípidos contienen cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Los **gangliósidos** son lípidos de membrana de las células eucarióticas

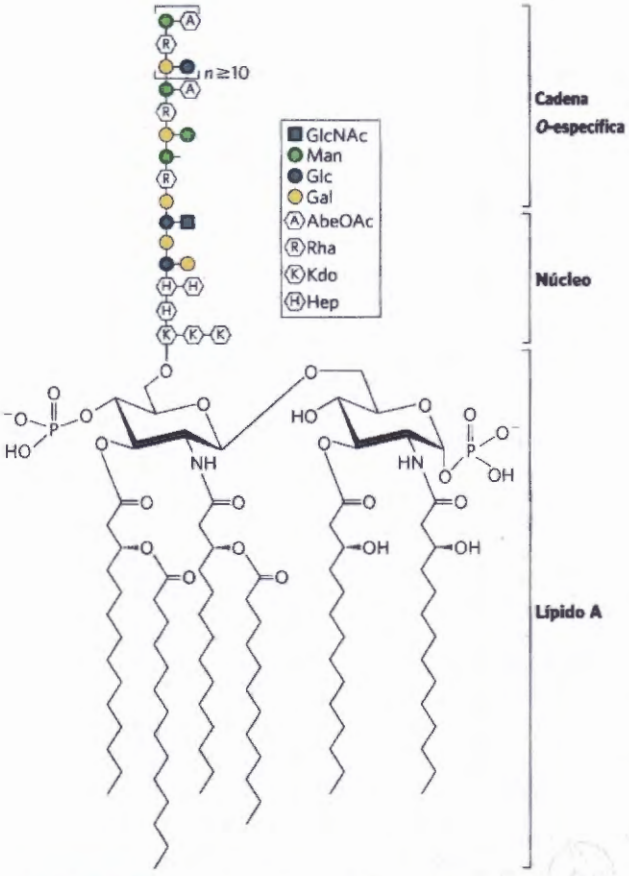


FIGURA 7-31 Lipopolisacáridos bacterianos. Esquema del lipopolisacárido de la membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo es el ácido 3-desoxi-D-*mano*-octulosónico, llamado anteriormente ácido cetodesoxioctónico; Hep es L-*glicero*-D-*mano*-heptosa; AbeOAc es abecuosa (una 3,6-didesoxihexosa), acetilada en uno de sus hidroxilos. Hay seis residuos de ácido graso en la porción del lípido A de la molécula. Diversas especies bacterianas tienen estructuras de lipopolisacáridos ligeramente diferentes, pero tienen en común una región lipídica (lípido A), un oligosacárido núcleo, también conocido como endotoxina y una cadena "*O*-específica", que es el determinante principal del serotipo (reactividad inmunológica) de la bacteria. La membrana externa de las bacterias gram-negativas *S. typhimurium* y *E. coli* contienen tantas moléculas de lipopolisacáridos que la superficie celular está prácticamente recubierta con cadenas *O*-específicas.

cuyo grupo de cabeza polar, la parte del lípido que forma la superficie externa de la membrana, es un oligosacárido complejo que contiene ácido siálico (Fig. 7-9) y otros residuos monosacáridos. Algunas de las porciones oligosacáridas de los gangliósidos, como, por ejemplo, aquéllas que determinan los grupos sanguíneos humanos (véase la Fig. 10-14), son idénticas a las encontradas en ciertas glucoproteínas y que, por tanto, también contribuyen a la determinación del grupo sanguíneo. Al igual que en el caso de la porción oligosacárida de las glucoproteínas, la de los lípidos de membrana se encuentra generalmente, tal vez siempre, en la cara externa de la membrana plasmática.

Los **lipopolisacáridos** son los componentes principales de la membrana externa de bacterias gram-negativas tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas moléculas son las dianas principales de los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a la infección bacteriana y son, por tanto, determinantes importantes del serotipo de las cepas bacterianas. (Los serotipos son cepas que se distinguen por sus propiedades antigénicas). Los lipopolisacáridos de *S. typhimurium* contienen seis ácidos grasos unidos a dos residuos de glucosamina, uno de los cuales es el punto de unión de un oligosacárido complejo **(Fig. 7-31)**. *E. coli* posee lipolisacáridos similares, pero singulares. La porción lípido A de los lipopolisacáridos de algunas bacterias se denomina endotoxina; su toxicidad para los humanos y otros animales es responsable del peligroso descenso de la presión sanguínea que se produce en el síndrome del shock tóxico, resultado de la infección por bacterias gram-negativas ■.

RESUMEN 7.3 Glucoconjugados: Proteoglucanos, glucoproteínas y glucolípidos

■ Los proteoglucanos son glucoconjugados en los cuales la proteína núcleo está unida covalentemente a uno o más glucanos de gran tamaño, denominados sulfatos de glucosaminoglucano (sulfato de heparán, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán o sulfato de queratán). Unidos al exterior de la membrana plasmática por un péptido de transmembrana o un lípido unido covalentemente, los proteoglucanos proporcionan puntos de adhesión, de reconocimiento y de transferencia de información entre células o entre la célula y la matriz extracelular.

■ Las glucoproteínas contienen oligosacáridos unidos covalentemente a través de residuos Asp o Ser/Thr. Los glucanos están, normalmente, ramificados y son de menor tamaño que los glucosaminoglucanos. Muchas proteínas de la superficie celular o extracelulares son glucoproteínas, como lo son la mayoría de las proteínas secretadas. Los oligosacáridos unidos covalentemente influyen en el plegamiento y en la estabilidad de las proteínas, suministran información esencial para el destino de las proteínas recién sintetizadas y permiten el reconocimiento específico por otras proteínas.

■ La glucómica consiste en la determinación del complemento completo de las moléculas que contienen azúcares en una célula o tejido y en la determinación de la función de cada una de estas moléculas.

■ Los glucolípidos y glucoesfingolípidos en plantas y animales y los lipopolisacáridos en las bacterias son componentes de la cubierta celular con cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente, expuestas en la superficie exterior de la célula.

7.4 Los glúcidos son moléculas que contienen información: el código de los azúcares

La glucobiología, definida como el estudio de la estructura y función de los gluconjugados, es una de las áreas más activas y estimulantes de la bioquímica y de la biología celular. Cada vez está más claro que las células utilizan oligosacáridos específicos para codificar información importante acerca del destino intracelular de las

proteínas, sobre las interacciones intercelulares, la diferenciación celular, el desarrollo de los tejidos y las señales extracelulares. Discutiremos unos pocos ejemplos para ilustrar la diversidad de la estructura y la variedad de actividades biológicas de los glucoconjugados. En el Capítulo 20 estudiaremos la biosíntesis de los polisacáridos, entre ellos el péptidoglucano y, en el Capítulo 27, la construcción de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas.

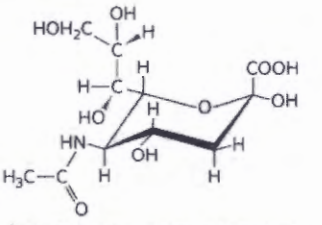
La mejora de los métodos de análisis de la estructura de los oligosacáridos y polisacáridos ha puesto de manifiesto la sorprendente complejidad y diversidad de los oligosacáridos de las glucoproteínas y glucolípidos. Considere las cadenas de oligosacárido de la Figura 7-30, representativas de las encontradas en muchas glucoproteínas. Las más complejas contienen 14 residuos de monosacárido de cuatro tipos diferentes, unidas por enlaces diversos tales como (1→2), (1→3), (1→4), (1→6), (2→3) y (2→6), algunos en configuración α y otros en configuración β. Las estructuras ramificadas, que no se encuentran en los ácidos nucleicos o en las proteínas, son frecuentes en los oligosacáridos. Partiendo de la suposición razonable de que para la síntesis de los oligosacáridos disponemos de 20 monosacáridos distintos, podemos calcular que son posibles muchos miles de millones de oligosacáridos hexaméricos distintos, en comparación con los 6,4 x10^7 (20^6) diferentes hexapéptidos posibles con los veinte aminoácidos comunes y los 4.096 (4^6) hexanucleótidos diferentes con los cuatro nucleótidos. Si además tenemos en cuenta las variaciones en los oligosacáridos que resultan de la sulfatación de uno o más residuos, el número de oligosacáridos posibles aumenta en dos órdenes de magnitud. De hecho, sólo se encuentra un subconjunto de combinaciones debido a las restricciones impuestas por los enzimas biosintéticos y por la disponibilidad de precursores. No obstante, la enorme riqueza de información estructural presente en los glucanos no sólo rivaliza sino que supera ampliamente la de los ácidos nucleicos en densidad de información contenida en una molécula de tamaño modesto. Cada uno de los oligosacáridos representados en las Figuras 7-24 y 7-30 presenta un aspecto tridimensional único -una palabra del código de los azúcares- reconocible por las proteínas que interaccionan con el mismo.

Las lectinas son proteínas que leen el código de los azúcares y que intervienen en muchos procesos biológicos

Las **lectinas**, presentes en todos los organismos, son proteínas que se unen a los glúcidos con una elevada especificidad y una afinidad entre moderada y alta. Las lectinas actúan en muchos procesos de reconocimiento intercelular, señalización y adhesión y en el destino intracelular de proteínas recién sintetizadas. Las lectinas vegetales, abundantes en las semillas, actúan, probablemente, como disuasores para los insectos y otros depredadores. En el laboratorio, las lectinas vegetales purificadas se utilizan como reactivos útiles para la detección y separación de glucanos y glucoproteínas con porciones oligosacáridas diferentes. Aquí sólo discutiremos unos pocos ejemplos de las funciones de las lectinas en las células animales.

Algunas homonas peptídicas que circulan en la sangre tienen porciones de oligosacárido que influyen decisivamente en su vida media en circulación. La hormona luteinizante y la tirotropina (hormonas polipeptídicas producidas en la hipófisis) tienen oligosacáridos *N*-unidos que terminan con el disacárido GalNAc4S(β1→4)GlcNAc, que es reconocido por una lectina (receptor) de los hepatocitos. (GalNAc4S es la *N*-acetilgalactosamina sulfatada en el grupo —OH del C-4.) La interacción hormona-receptor interviene en la captación y degradación de la hormona luteinizante y la tirotropina, reduciendo su concentración en sangre. De este modo, los niveles en sangre de estas hormonas experimentan un aumento (debido a la secreción pulsátil por la hipófisis) y una disminución (debido a la destrucción por los hepatocitos) periódicos.

Los residuos de Neu5Ac (un ácido siálico) situados en los extremos de las cadenas de oligosacáridos de muchas glucoproteínas plasmáticas (Fig. 7-24) protegen a esas proteínas de la captación y degradación por el hígado. Por ejemplo, la ceruloplasmina es una glucoproteína sérica que contiene cobre y que posee varias cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. No está claro el mecanismo de eliminación de los residuos de ácido siálico de las glucoproteínas séricas. Puede ser debido a la actividad del enzima neuraminidasa (también denominado sialidasa) producido por los organismos invasores o a una liberación lenta pero continuada debida a enzimas extracelulares. La membrana plasmática de los hepatocitos tiene moléculas de lectina (receptores de asialoglucoproteínas; "asialo-" indica "sin ácido siálico") que se unen específicamente a las cadenas de oligosacáridos con residuos de galactosa que ya no están "protegidos" por un residuo terminal de Neu5Ac. La interacción receptor-ceruloplasmina provoca la endocitosis y la destrucción de la ceruloplasmina.



Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac)
(un ácido siálico)

Parece ser que un mecanismo similar es responsable de la eliminación de los eritrocitos "viejos" de la sangre de mamíferos. Los eritrocitos recién sintetizados tienen varias glucoproteínas de membrana con cadenas de oligosacárido que terminan en Neu5Ac. Cuando se eliminan los residuos de ácido siálico al retirar una muestra de sangre de animales de experimentación, por tratamiento con neuraminidasa in vitro y posteriormente se reintroduce la muestra en el torrente circulatorio, los eritrocitos tratados desaparecen de la circulación sanguínea en el plazo de pocas horas; los eritrocitos con los oligosacáridos intactos (extraídos y reintroducidos sin tratamiento con neuraminidasa) continúan circulando durante días.

Las lectinas de la superficie celular –tanto las lectinas humanas como las lectinas de los agentes infecciosos- son importantes en el desarrollo de algunas enfermedades humanas. Las **selectinas** son una familia

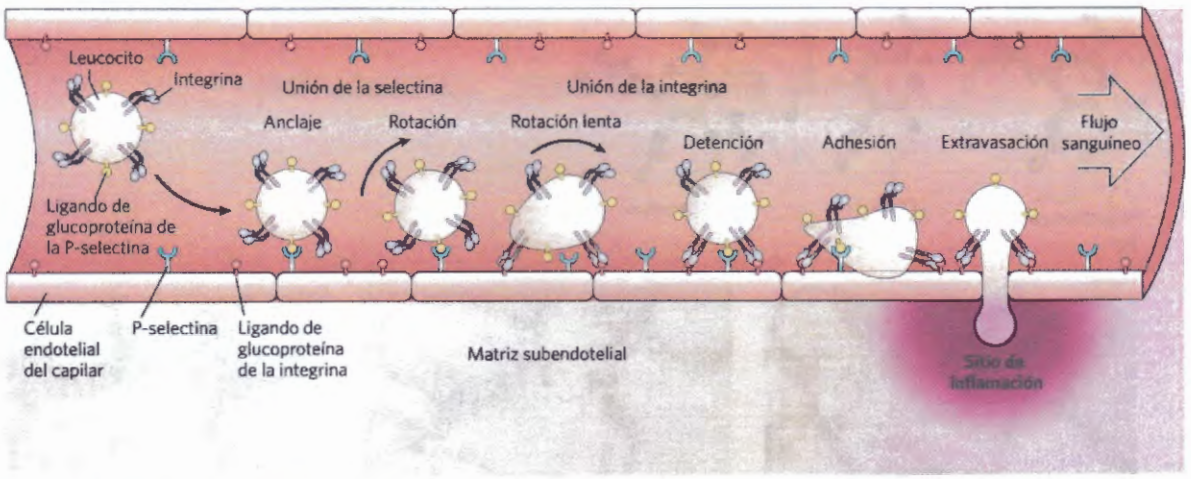


FIGURA 7-32 Papel de las interacciones lectina-ligando en el movimiento de los leucocitos hacia el lugar de una infección o una lesión. Un leucocito que circula por un capilar se retrasa debido a interacciones transitorias entre las moléculas de P-selectina de la membrana plasmática de las células endoteliales del capilar y los ligandos glucoproteicos de la P-selectina situados en la superficie del leucocito. A medida que el leucocito interacciona con sucesivas moléculas de P-selectina, los leucocitos ruedan a lo largo de la superficie del capilar. En las proximidades de la zona de inflamación, interacciones más fuertes entre la integrina en la superficie del neutrófilo y sus ligandos de la superficie del capilar conducen a una fuerte adhesión. El leucocito deja de rodar y, bajo la influencia de señales procedentes de la zona de inflamación, comienza la extravasación (paso a través de la pared del capilar) mientras se dirige al lugar de la inflamación.

de lectinas que se encuentran en la membrana plasmática y que intervienen en el reconocimiento y adhesión intercelular en una amplia gama de procesos celulares. Uno de estos procesos es el movimiento de las células del sistema inmune (leucocitos) a través de las paredes de los capilares, desde la sangre hacia los tejidos en los lugares de infección o inflamación **(Fig. 7-32)**. En una zona infectada, la P-selectina de la superficie de las células endoteliales de los capilares interacciona con un oligosacárido específico de las glucoproteínas de la superficie de los leucocitos circulantes. Esta interacción frena el movimiento de los leucocitos cuando se desplazan a lo largo del revestimiento endotelial de los capilares. Una segunda interacción, entre las moléculas de integrina de la membrana plasmática de los leucocitos y una proteína de adhesión de la superficie de la célula endotelial, detiene ahora los leucocitos y hace posible su paso a través de la pared del capilar hacia los tejidos infectados para iniciar el ataque inmunológico. Otras dos selectinas participan en esta "vuelta a casa de los linfocitos": la E-selectina en las células endoteliales y la L-selectina en los leucocitos, se unen a sus correspondientes oligosacáridos del leucocito y de la célula endotelial, respectivamente.

Las selectinas humanas intervienen en las respuestas inflamatorias asociadas a la artritis reumatoide, asma, psoriasis, esclerosis múltiple y en el rechazo de órganos transplantados, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de fármacos que inhiban la adhesión celular producida por selectinas. Muchos carcinomas expresan un antígeno que normalmente sólo está presente en las células fetales (sialil Lewis x o sialil Le^x) que, cuando se introduce en la circulación, facilita la supervivencia de las células tumorales y la metástasis. Derivados glucídicos que imitan la porción sialil Le^x de las sialoglucoproteínas o que alteran la biosíntesis del oligosacárido podrían ser efectivos como fármacos específicos de selectina para tratar la inflamación crónica o la enfermedad metastásica.

Diversos virus animales, entre los que se encuentra el virus de la gripe, se unen a sus células huésped a través de interacciones con oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula huésped. La lectina del virus de la gripe, conocida como proteína HA (hemaglutinina), es esencial para la entrada del virus y posterior infección. Después de la entrada del virus en una célula huésped y de su replicación, las partículas víricas recién sintetizadas salen de la célula por gemación envueltas en una porción de su membrana plasmática. Una sialidasa vírica (neuraminidasa) corta el residuo terminal de ácido siálico de los oligosacáridos de la célula huésped lo que libera las partículas víricas de su interacción con la célula e impide su agregación entre ellas. Puede iniciarse ahora otra ronda de infección. Los fármacos antivíricos oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza) se utilizan clínicamente en el tratamiento de la gripe. Estos medicamentos son análogos de azúcares; inhiben la sialidasa vírica al competir con los oligosacáridos de la célula huésped para unirse a ella **(Fig. 7-33)**. Esto impide la liberación de virus desde la célula infectada al mismo tiempo que induce la agregación de las partículas víricas, dos procesos que bloquean el ciclo de infección siguiente.

Algunos patógenos microbianos tienen lectinas que intervienen en la adhesión bacteriana a las células huésped o en la entrada de toxinas en las células. Por ejemplo, la bacteria *Helicobacter pylori*, tiene una lectina en la superficie que se adhiere a oligosacáridos de la superficie de las células epiteliales que recubren la superficie interna del esstómago **(Fig. 7-34)**. Entre los sitios de unión que reconoce la lectina de *H. pylori* se encuentra el oligosacárido Lewis b (Le^b) que se encuentra presente en las glucoproteínas y glucolípidos determinantes del grupo sanguíneo de tipo O (véase la Fig. 10-14). Esta observación ayuda a explicar la incidencia varias veces superior de úlceras gástricas en las personas del grupo sanguíneo O respecto a las de tipo A o B;

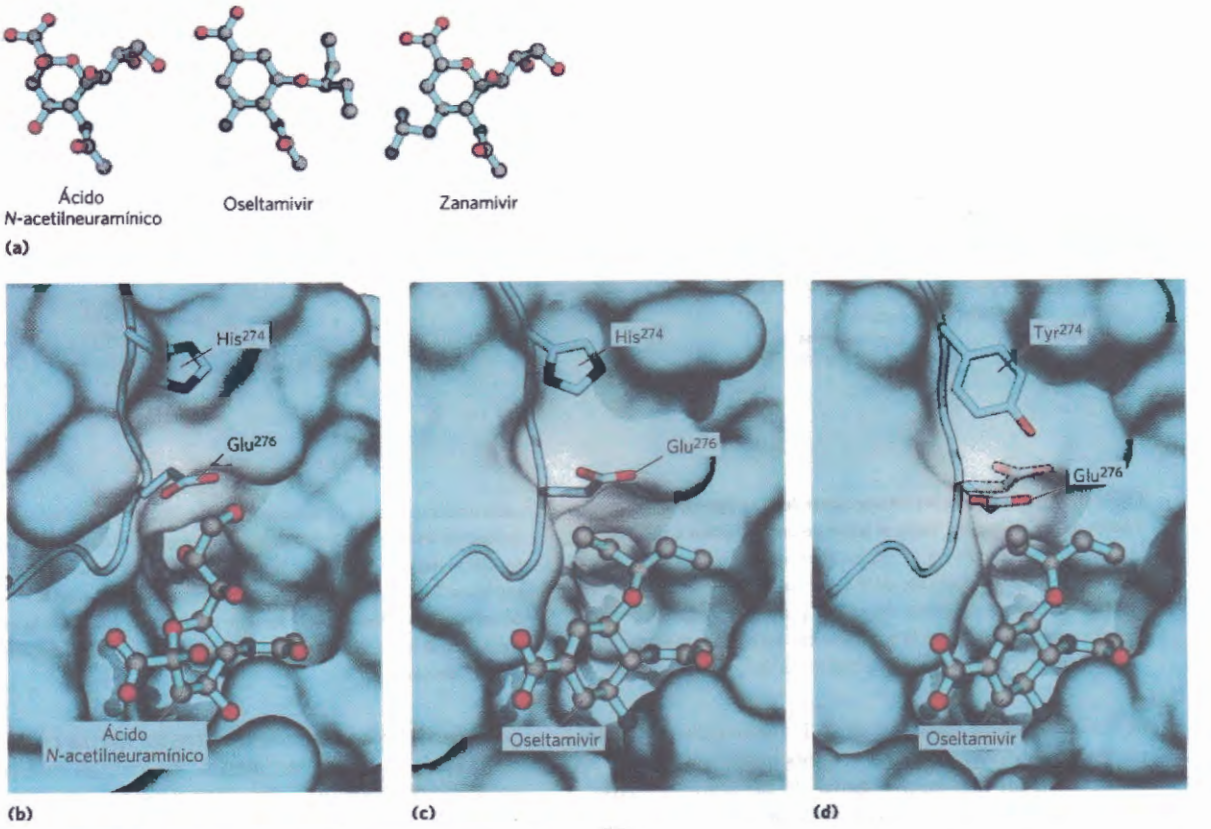


FIGURA 7-33 Sitio de unión del ácido *N*-acetilneuramínico y el fármaco antiviral oseltamivir en la neuraminidasa de la gripe. **(a)** El ligando normal que se une a este enzima es un ácido siálico, el ácido *N*-acetilneuramínico. Los fármacos oseltamivir y zanamivir ocupan el mismo sitio del enzima inhibiéndolo de manera competitiva y bloqueando la liberación de virus desde la célula huésped. **(b)** Interacción normal con el ácido *N*-acetilneuramínico. **(c)** El oseltamivir puede encajar en este sitio al empujar un residuo Glu cercano lo que le deja vía libre. **(d)** Una mutación en el gen de la neuraminidasa del virus de la gripe reemplaza una His cerca de este residuo Glu con una cadena más voluminosa de una Tyr (PDB ID 3CLO). Ahora el oseltamivir se fija mucho peor al sitio de unión con lo que el virus mutante adquiere resistencia al oseltamivir. [Fuenters: (b) PDB ID 2BAT, J. N. Varghese et al., *Proteins*, 14:327, 1992. (c) PDB ID 2HU4, R. J. Russell et al., *Nature*, 443:45, 2006. (d) P. J. Collins, *Nature* 453:1258, 2008.]

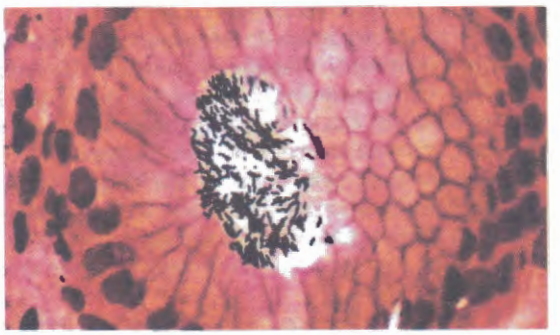


FIGURA 7-34 Una úlcera en desarrollo. Las células de *Helicobacter pylori* se adhieren a la superficie gástrica. Esta bacteria produce úlceras debidas a las interacciones entre una lectina de la superficie bacteriana y el oligosacárido Leb (un antígeno de grupo sanguíneo) de las células que cubren la superficie interior del epitelio gástrico. [Fuente: R. M. Genta/Miraca Life Science Research Institue, Irving, Texas y D. Y. Graham/Veterans Affairs Medical Center, Houston, Texas.]

H. pylori ataca sus células epiteliales con mayor efectividad. Los análogos del oligosacárido Le^b sintetizados químicamente podrían ser de utilidad en el tratamiento de este tipo de úlceras. Administrados oralmente, podrían impedir la adhesión bacteriana (y, por tanto, la infección) compitiendo con las glucoproteínas gástricas en su unión a las lectinas bacterianas.

Algunas de las enfermedades parasitarias humanas más devastadoras, de gran incidencia en gran parte de los países en vías de desarrollo, están causadas por microorganismos eucarióticos que exhiben unos oligosacáridos de superficie poco frecuentes que, en algunos casos, se ha visto que protegen al parásito. Entre estos organismos se cuentan los tripanosomas responsables de la enfermedad del sueño africana y la enfermedad de Chagas (véase el Recuadro 6-3); el *Plasmodium falciparum*, que es el parásito de la malaria y la *Entamoeba histolytica*, agente causal de la disentería amebiana. La perspectiva de encontrar fármacos que interfieran con la síntesis de estas cadenas de oligosacárido raras y, por consiguiente, con la replicación de los parásitos, ha inspirado muchos trabajos realizados recientemente sobre las rutas biosintéticas de estos oligosacáridos ■.

Las lectinas también actúan en el interior de la célula en la clasificación para el transporte a compartimientos celulares específicos (véase el Capítulo 27). Por ejemplo, las proteínas recién sintetizadas destinadas a los lisosomas se marcan en el complejo de Golgi con un oligosacárido que contiene manosa 6-fosfato que es reconocido por una lectina (véase la Fig. 27-41).

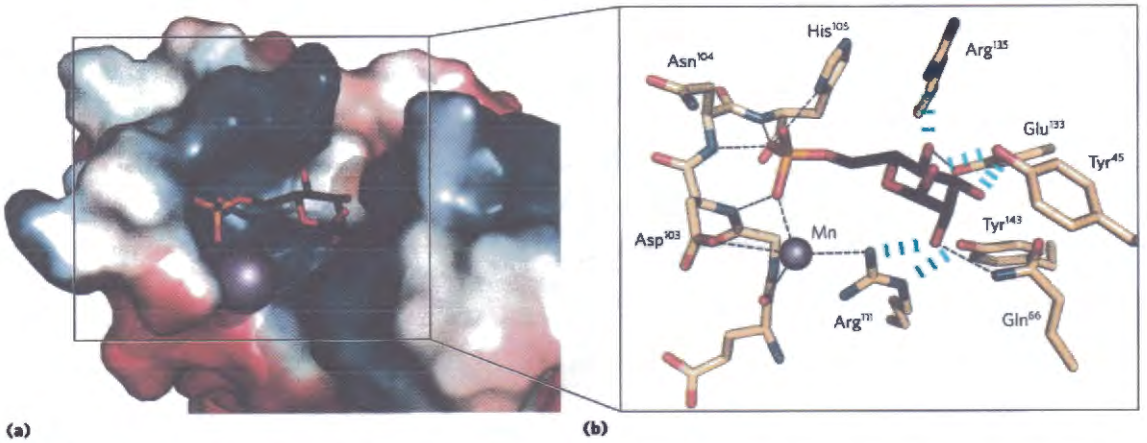


FIGURA 7-35 La interacción lectina-glúcido en detalle. Estructura del receptor bovino de manosa 6-fosfato en el complejo con manosa 6-fosfato. Se muestra una imagen de contorno superficial de la proteína, mostrando la superficie como predominantemente negativa (rojo) o cargada positivamente (azul). La manosa 6-fosfato se representa como una estructura de varillas; se muestra un ión manganeso como un esfera violeta. **(b)** Vista ampliada del sitio de unión. La manosa 6-fosfato forma un puente de hidrógeno con la Arg^{171} y está coordinada con el ión manganeso (que se muestra más pequeño que su radio de van der Waals por razones de claridad). Cada grupo hidroxilo de la manosa forma puente de hidrógeno con la proteína. La His^{105}, que forma un puente de hidrógeno con un oxígeno del fosfato de la manosa 6-fosfato, puede ser el residuo que cuando se protona a pH bajo provoca la liberación de la manosa 6-fosfato por el receptor al interior del lisosoma. [Fuente: (a, b) PDB ID 1M6P. D. I. Roberts et al., *Cell* 93:639, 1998.]

Las interacciones lectina-glúcido son muy específicas y, a menudo, polivalentes

La gran densidad de información en la estructura de los oligosacáridos proporciona un código de los azúcares con un número virtualmente ilimitado de "palabras" diferentes suficientemente pequeñas para ser leídas por una única proteína. En sus sitios de unión de glúcidos, las lectinas poseen una sutil complementariedad molecular necesaria para permitir la interacción solamente con los glúcidos afines correctos. El resultado es una especificidad de estas interacciones extraordinariamente elevada. La afinidad entre un oligosacárido y cada dominio de unión de glúcido (CBD, Carbohydrate Binding Domain) de una lectina es a veces modesto (valores de K_d micromolar a milimolar), pero la afinidad efectiva se incrementa grandemente en muchos casos por la multivalencia de la lectina, en la que una única molécula de lectina tiene múltiples CBD. En un agrupamiento de oligosacáridos -tal como, por ejemplo, se encuentra frecuentemente en una superficie de membrana- cada oligosacárido puede ocupar uno de los CBD de la lectina, con lo que se refuerza la interacción. Cuando las células expresan múltiples receptores de lectina, la afinidad de la interacción puede ser muy elevada, permitiendo procesos altamente cooperativos tales como la unión celular y la rotación (véase la Fig. 7-32).

Los estudios cristalográficos con rayos X de la estructura del receptor de manosa 6-fosfato/lectina revela detalles de su interacción con la manosa 6-fosfato que explican la especificidad de la unión y el papel de un catión divalente en la interacción lectina-azúcar **(Fig. 7-35a)**. La His105 forma un puente de hidrógeno con uno de los átomos de oxígeno del fosfato (Fig. 7-35b). Cuando la proteína marcada con manosa 6-fosfato alcanza el lisosoma (que tiene un pH interno inferior al del complejo de Golgi), el receptor pierde afinidad por la manosa 6-fosfato. La protonación de la His105 puede ser responsable de este cambio de afinidad.

Además de estas interacciones tan específicas, hay interacciones más generales que contribuyen a la unión de muchos glúcidos a las lectinas. Por ejemplo, muchos azúcares tienen un lado más polar y otro menos polar **(Fig. 7-36)**; el lado más polar forma puentes de hidrógeno con la lectina, mientras que el menos polar establece con residuos aminoácidos apolares a través del efecto hidrofóbico. La suma de todas estas interacciones hace que la unión entre las lectinas y los glúcidos sea de gran afinidad y especificidad. Ello representa un tipo de transferencia de información esencial en muchos procesos intercelulares e intracelulares. La **Figura 7-37** resume algunas de las interacciones biológicas en las que interviene el código de los azúcares.

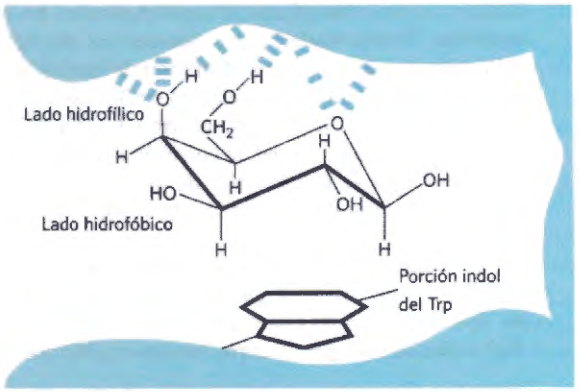


FIGURA 7-36 Interacciones de los residuos de azúcar debidas al efecto hidrofóbico. Las unidades de azúcar tales como la galactosa tienen un lado más polar (la parte superior de la silla tal como se muestra aquí, con el oxígeno del anillo y varios hidroxilos), que está disponible para formar puentes de hidrógeno con la lectina, y un lado menos polar que puede establecer interacciones con cadenas laterales apolares de la proteína, tales como el anillo indol de residuos Trp, mediante el efecto hidrofóbico. [Fuente: Información de una figura proporcionada por el Dr. C.-W. von der Lieth, Heidelberrg; H.-J Gabius, *Naturwissenschaften*, 87:108, 2000, Fig. 6.]

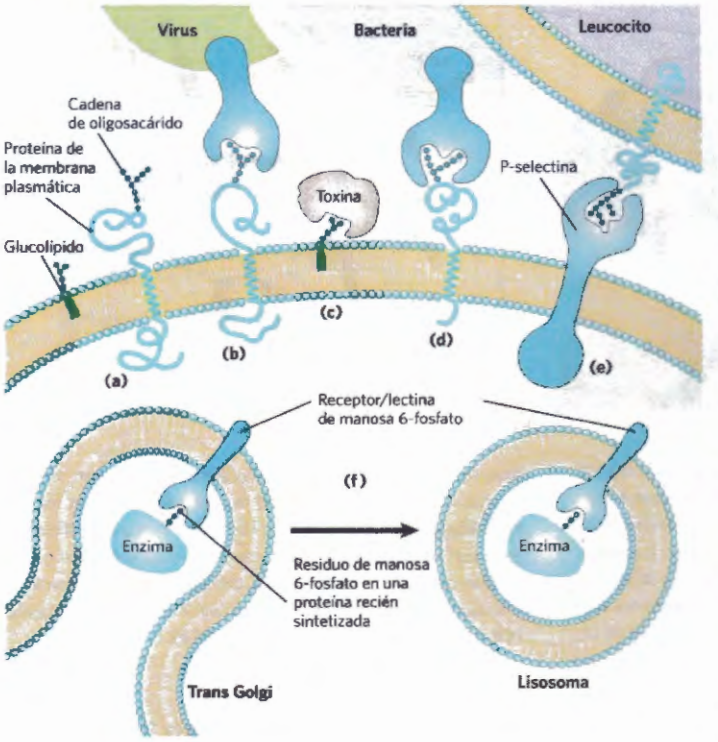


FIGURA 7-37 Papel de los oligosacáridos en el reconocimiento sobre la superficie celular y en el sistema endomembranoso. **(a)** Oligosacáridos con estructura única (representados como ristras de hexágonos) forman parte de una gran variedad de gluocoproteínas o glucolípidos, localizados en la superficie externa de la membrana plasmática. Sus porciones oligosacáridas se unencon elevada especificidad y afinidad con lectinas del medio extracelular. **(b)** Los virus que infectan células animales, tales como el virus de la gripe, se unen a glucoproteínas de la superficie celular en el primer paso de la infección. **(c)** Las toxinas bacterianas, tales como las toxinas del cólera y de la tosferina, se unen a glucolípidos de la superficie antes de entrar en una célula. **(d)** Algunas bacterias, tales como *H. pylori*, se adhieren a las células animales para después colonizarlas o infectarlas. **(e)** Las selectinas (lectinas) de la membrana plasmática de ciertas células intervienen en las interacciones intercelulares, tal como ocurre con los leucocitos y las células endoteliales de la pared capilar en un sitio de infección. **(f)** El receptor/lectina de la manosa 6-fosfato del complejo trans de Golgi se une a los oligosacáridos de enzimas lisosómicos, destinándolos a los lisosomas. [Fuente: Información de N. Sharon y H. Lis, *Sci. Amer.* 268 (enero), 82, 1993.]

RESUMEN 7.4 Los glúcidos como moléculas portadoras de información: El código de los azúcares

- Los monosacáridos pueden unirse dando una serie prácticamente ilimitada de oligosacáridos, que difieren en estereoquímica y posición de los enlaces glucosídicos, tipo y orientación de los grupos sustituyentes y número y tipo de ramificaciones. Los glucanos contienen una densidad de información mucho mayor que los ácidos nucleicos y las proteínas.
- Las lectinas, proteínas con dominios de unión de glúcidos de gran especificidad, se encuentran normalmente en la superficie exterior de las células, donde inician la interacción con otras células. En los vertebrados, los oligosacáridos, "interpretados" como señales por las lectinas, gobiernan la velocidad de degradación de ciertas hormonas peptídicas, proteínas circulantes y células sanguíneas.
- La adherencia de patógenos víricos y bacterianos, así como de algunos parásitos eucarióticos, a sus células animales diana es el resultado de la unión de lectinas del patógeno con oligosacáridos de la superficie de las células diana.
- La cristalografía de rayos X de complejos lectina-azúcar muestra la detallada complementariedad de las dos moléculas, lo que explica la fuerza y especificidad de las interacciones entre lectinas y glúcidos.

7.5 Trabajando con glúcidos

Una aceptación creciente de la importancia de la estructura de los oligosacáridos en el reconocimientoy señalización biológicos ha sido el estímulo que ha impulsado el desarrollo de métodos de análisis de la estructura y la estereoquímica de los oligosacáridos complejos. El análisis de oligosacáridos es complicado, pues, a diferencia de los ácidos nucleicos y las proteínas, pueden estar ramificados y unirse con varios enlaces diferentes. La elevada densidad de carga de muchos oligo- y polisacáridos así como la relativa labilidad de los ésteres sulfato de los glucosaminoglucanos, son dificultades añadidas

Para polímeros simples y lineales tales como la amilosa, las posiciones de los enlaces glucosídicos se determinan por el método clásico de la metilación exhaustiva: se trata el polisacárido intacto con yoduro de metilo en medio fuertemente básico para convertir todos los hidroxilos libres en éteres metílicos estables en medio ácido. A continuación el polisacárido metilado se hidroliza en medio ácido. Los únicos grupos hidroxilo libres presentes en los derivados monosacáridos así producidos son los que estaban implicados en enlaces glucosídicos. Para determinar la secuencia de los residuos de monosacáridos, incluidas las ramas presentes, se utilizan exoglucosidasas de especificidad conocida para eliminar los residuos uno a uno del extremo o extremos no reductores. La especificidad conocidā de estas exoglucosidasas permite, a menudo, deducir la posición y la estereoquímica de los enlaces.

Para el análisis de la porción oligosacárida de las glucoproteínas y glucolípidos se pueden liberar los oligosacáridos mediante enzimas purificados: las glucosidasas que rompen específicamente enlaces *O*- o *N*- de oligosáridos o las lipasas que separan lo grupos lipídicos de cabeza. De manera alternativa, los glucanos *O*-unidos pueden liberarse de las glucoproteínas mediante tratamiento con hidracina.

Las mezclas de glúcidos resultantes se resuelven en sus componentes individuales mediante un gran número de métodos **(Fig. 7-38)** entre los que se encuentran las mismas técnicas utilizadas en la separación de proteínas y aminoácidos: precipitación fraccionada mediante disolventes, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (véase la Fig. 3-17). Lectinas altamente purificadas, unidas covalente-

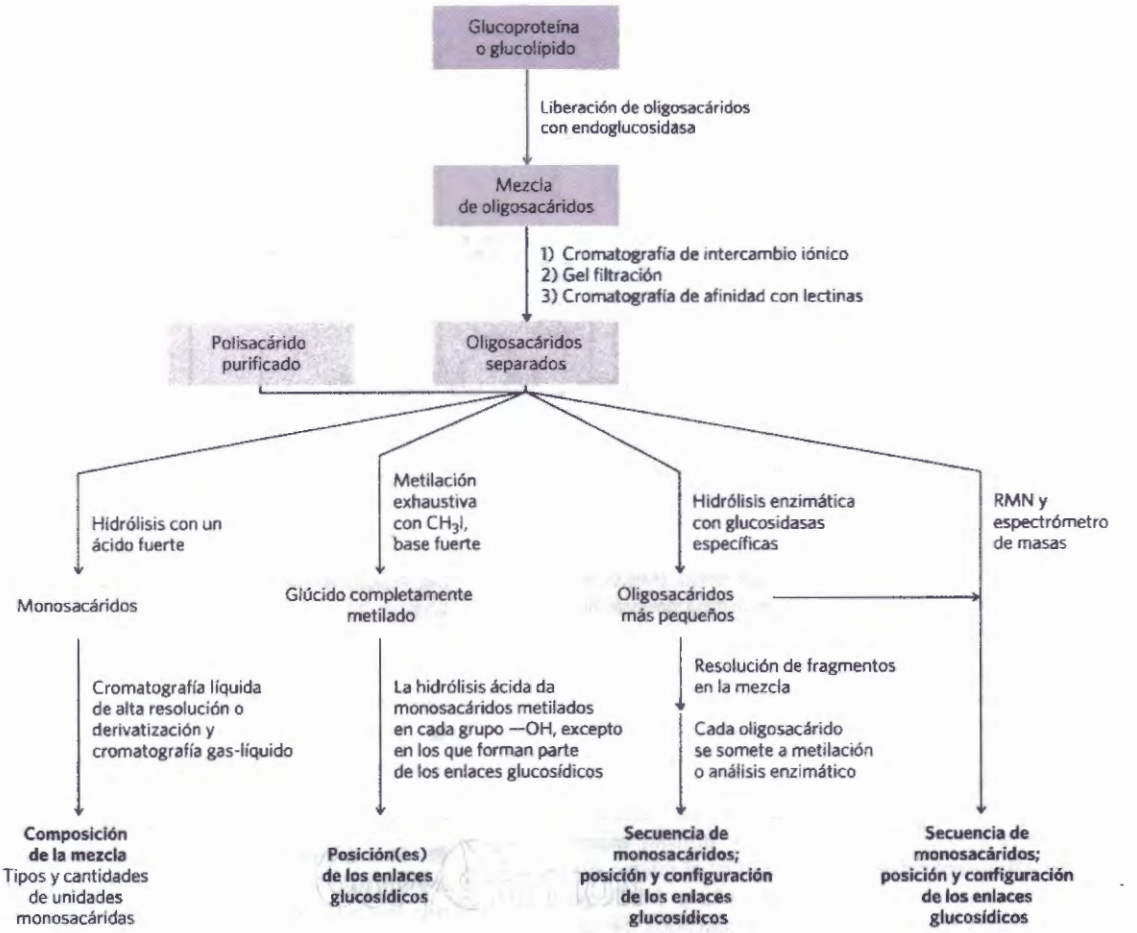


FIGURA 7-38 Métodos de análisis de glúcidos. Un glúcido purificado en el primer paso de su análisis necesita a menudo las cuatro rutas analíticas para su caracterización completa.

mente a un soporte insoluble, se utilizan habitualmente en la cromatografía de afinidad de glúcidos.

La hidrólisis de oligosacáridos y polisacáridos en ácidos fuertes proporciona una mezcla de monosacáridos que se pueden identificar y cuantificar por técnicas cromatográficas para obtener la composición global del polímero.

El análisis de oligosacáridos se basa cada vez más en la espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución. La espectrometría de masas por desadsorción/ionización por láser facilitada por matriz (MALDI MS) y la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), ambas descritas en el Capítulo 3, son fácilmente aplicables a compuestos polares tales como los oligosacáridos. La MALDI MS es un método muy sensible para determinar la masa de un ión molecular (la cadena completa de oligosacárido). La MALDI MS es un método muy sensible que suministra la masa molecular de unl ión molecular (en este caso la cadena completa de oligosacárido; **Fig. 7-39**). MS/MS revela la masa del ión molecular y de muchos de sus fragmentos, obtenidos normalmente por rotura de los enlaces glucosídicos. El análisis de RMN por sí solo (véase el Recuadro 4-5), especialmente para oligosacáridos de tamaño medio, puede proporcionar mucha información sobre la secuencia, la posición de los enlaces y la configuración del carbono anomérico. Por ejemplo, la estructura del fragmento de heparina mostrado en forma de modelo espacial en la Fig. 7-22 se obtuvo completamente por espectroscopia RMN. Se utilizan procedimientos automatizados e instrumentos comerciales para las determinaciones de rutina de la estructura de los oligosacáridos, pero la secuenciación de los oligosacáridos ramificados unidos por más de un tipo de enlace continúa siendo mucho más difícil que la determinación de las secuencias lineales de proteínas o ácidos nucleicos.

Otra herramienta importante al trabajar con glúcidos es la síntesis química que se ha convertido en un medio poderoso para entender las funciones biológicas de los glucosaminoglucanos y oligosacáridos. La química que está en la base de tales síntesis es difícil pero en la actualidad los químicos expertos en glúcidos pueden sintetizar pequexños segmentos de casi cualquier glucosaminoglucano, con la estereoquímica correcta, longitud de cadena y patrón de sulfatación así como oligosacáridos significativamente más complejos que los que se muestran en la Figura 7-30. La síntesis de oligosacáridos en fase sólida se basa en los mismos principios (y tiene las mismas ventajas) que la síntesis de péptidos (véase le Fig. 3-32), pero requiere un conjunto de herramientas propias de la química de glúcidos: grupos de bloqueo y grupos activadores que permitan la síntesis de enlaces glucosídicos con el grupo hidroxilo correcto. Enzimas altamente purificados (glucosiltransferasas) deberían

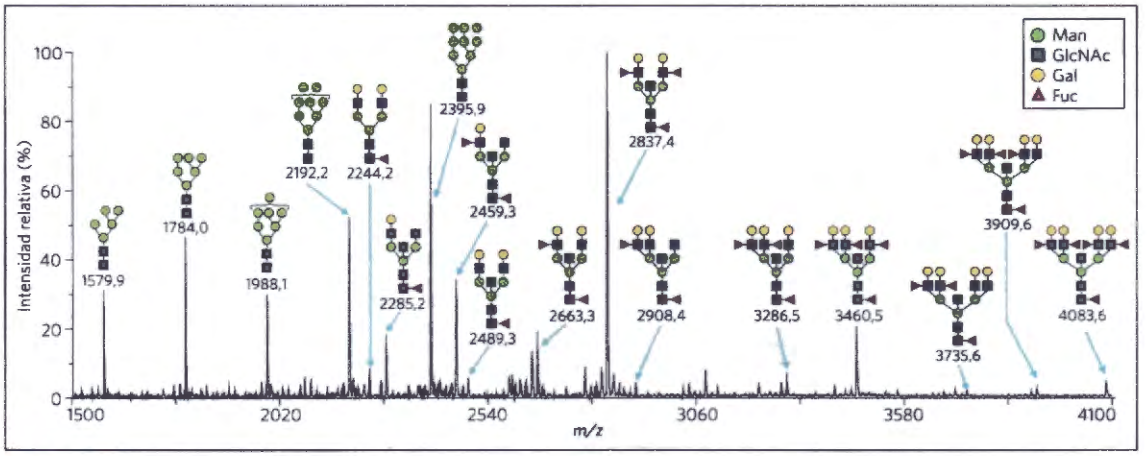


FIGURA 7-39 Separación y cuantificación de los oligosacáridos en un grupo de glucoproteínas. En este experimento se trató la mezcla de proteínas extraídas del tejido renal para liberar oligosacáridos de las glucoproteínas siendo analizados mediante espectrometría de masas por desadsorción/ionización por láser facilitada por matriz (MALDI MS). Cada oligosacárido concreto produce un pico en su masa molecular mientras que el área debajo de la curva refleja la cantidad de ese oligosacárido. Aquí el oligosacárido más prominente (masa 2837,4 u) está compuesto por 13 residuos de azúcar; en esta muestra, otros oligosacáridos que van de 7 a 19 residuos también se resuelven con este método. [Fuente: Cortesía de Anne Dell. Reproducido con permiso de E. M. Comelli et al., *Glycobiology*, 16:117, 2006, Fig. 3.]

ser de gran ayuda en la preparación de compuestos sintéticos puros. Enfoques sintéticos de este tipo son representativos de un área de gran interés en la actualidad ya que es difícil purificar en cantidades suficientes oligosacáridos definidos a partir de su fuente natural.

Para identificar proteínas con afinidad específica para oligosacáridos concretos se utilizan **microchips de oligosacáridos**. El principio es el mismo que el de los microchips de DNA (Figs. 9-22 y 9-23), pero los problemas técnicos son más complicados. Se unen oligosacáridos puros, en forma de microgotas, a un portaobjetos de vidrio y se exponen a una lectina potencial (proteína fijadora de glucano) que ha sido marcada con una molécula fluorescente **(Fig. 7-40)**. Después de eliminar por lavado toda la proteína que no ha sido absorbida, la observación de los microchips con un microscopio de fluorescencia identifica los oligosacáridos reconocidos por la lectina; la cuantificación de la fluorescencia da una medida aproximada de la afinidad lectina-oligosacárido.

RESUMEN 7.5 Trabajando con glúcidos

- La determinación completa de la estructura de oligosacáridos y polisacáridos requiere establecer la secuencia lineal, las posiciones de ramificación, la configuración de cada unidad de monosacárido y las posiciones de los enlaces glucosídicos, un problema más complejo que el análisis de proteínas y ácidos nucleicos.
- Las estructuras de los oligosacáridos y de los polisacáridos se determinan normalmente mediante una combinación de métodos: hidrólisis enzimática específica para determinar la estereoquímica en el enlace glucosídico y producir fragmentos menores para su posterior análisis; metilación para localizar los enlaces glucosídicos y una degradación escalonada para determinar la secuencia y la configuración de los carbonos anoméricos.
- La espectrometría de masas y la espectroscopia de RMN de alta resolución, aplicables a pequeñas muestras de glúcidos, suministran información esencial sobre la secuencia, la configuración en los carbonos anoméricos y en otros carbonos y las posiciones de los enlaces glucosídicos.
- Métodos de síntesis en fase sólida proporcionan oligosacáridos definidos que son de gran valor en la exploración de las interacciones lectina-oligosacárido y que podrían ser de utilidad clínica.
- Microchips de oligosacáridos pùros son útiles en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de una lectina a oligosacáridos específicos.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

glucoconjugado 243
glúcido 243
monosacárido 243
oligosacárido 243
disacárido 243
polisacárido 243
aldosa 244
cetosa 244
fórmulas de proyección de Fisher 244
epímeros 245
hemiacetal 245
hemicetal 245
anómeros 246
carbono anomérico 246
piranosa 246
furanosa 246
fórmulas en perspectiva de Haworth 247
mutarrotación 248
glucación de la hemoglobina 250
azúcar reductor 251
enlaces *O*-glucosídicos 252
extremo reductor 252
glucano 254
homopolisacárido 254
heteropolisacárido 254
almidón 255
glucógeno 256
celulosa 257
matriz extracelular (ECM) 260
glucosaminoglucano 260
hialuronano 261
sulfato de condroitina 261
sulfato de heparán 261
proteoglucano 263
glucoproteína 263
glucoesfingo-lípido 263
sindecano 264
glupicano 264
glucómica 268
lectina 270
selectinas 270
microchips de oligosacáridos 276

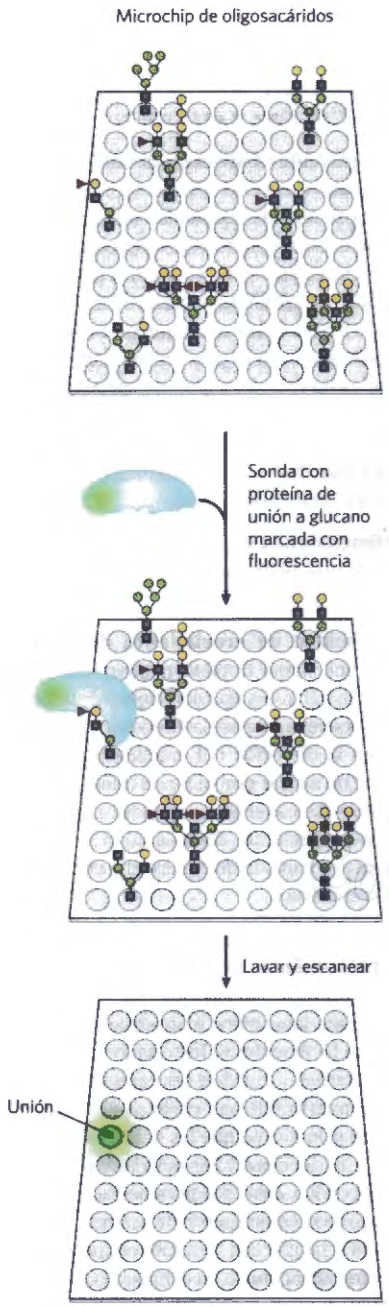


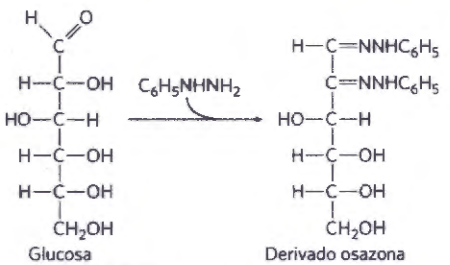
FIGURA 7-40 Microchips de oligosacáridos para determinar la especificidad y afinidad de la unión de glúcidos con las lectinas. Sobre un portaobjetos de vidrio se colocan soluciones de muestras puras de oligosacáridos, sintetizados o aislados de la naturaleza, en forma de gotas microscópicas. Los oligosacáridos se unen al vidrio mediante un espaciador inerte. Cada mancha representa un oligosacárido diferente. La muestra de proteína de la que se ha de analizar su afinidad hacia los oligosacáridos, se conjuga previamente con un marcador fluorescente y, a continuación, la muestra se vierte sobre el portaobjetos, se deja que se equilibre y finalmente la proteína no adsorbida se elimina por lavado. La observación del microchip con un microscopio de fluorescencia muestra qué manchas han absorbido proteína (brilla con color verde) mientras que una evaluación de la intensidad de la fluorescencia da una medida grosera de la afinidad de unión entre proteína y oligosacárido. [Fuente: Información de P.H. Seeberger, *Nature Chem. Biol.* 5:368, 2009, Fig. 2a.]

Problemas

1. Azúcares alcoholes El oxígeno del grupo carbonilo se reduce dando un grupo hidroxilo en los derivados monosacáridos conocidos como azúcares alcoholes. Por ejemplo, el D-gliceraldehído se puede reducir a glicerol. Sin embargo, este azúcar alcohol ya no se designa como D o L. ¿Por qué?

2. Reconocimiento de epímeros Utilizando la Figura 7-3, identifique los epímeros de (a) D-alosa, (b) D-gulosa y (c) D-ribosa en los carbonos C-2, C-3 y C-4.

3. Los puntos de fusión de los derivados osazona de monosacáridos Muchos glúcidos reaccionan con la fenilhidracina ($C^6H^5NHNH^2$) para formar derivados cristalinos de color amarillo brillante conocidos como osazonas:



Las temperaturas de fusión de estos derivados se determinan fácilmente y son características de cada osazona. Esta información se utilizó para ayudar a identificar los monosacáridos antes del desarrollo de la HPLC o de la cromatografía gas-líquido. Debajo hay un listado de los puntos de fusión (P.F.) de algunos derivados aldosa-osazona:

Monosacárido	P.F. del monosacárido anhidro (°C)	P.F. del derivado osazona (°C)
Glucosa	146	205
Manosa	132	205
Galactosa	165–168	201
Talosa	128–130	201

Tal como se muestra en la tabla, ciertos pares de derivados tienen los mismos puntos de fusión, cosa que no ocurre en los monosacáridos no derivados. ¿Por qué la glucosa y la manosa por un lado y, la galactosa y la talosa por otro forman derivados osazona con los mismos puntos de fusión?

4. Configuración y conformación ¿Qué enlace(s) de la α-D-glucosa debe(n) romperse para cambiar su configuración a β-D-glucosa? ¿Qué enlace(s) para convertir una forma "silla" de la D-glucosa en la otra?

5. Desoxiazúcares ¿Es la D-2-desoxigalactosa el mismo compuesto químico que la D-2-desoxiglucosa? Explíquelo.

6. Estrucuras de azúcares Describa las características estructurales comunes y las diferencias para cada par: (a) celulosa y glucógeno; (b) D-glucosa y D-fructosa; (c) maltosa y sacarosa.

7. Azúcares reductores Dibuje la fórmula estructural de la α-D-glucosil-(1→6)-D-manosamina y englobe en un círculo la parte de esta estructura responsable de que el compuesto sea un azúcar reductor.

8. Enlaces hemiacetal y glucosídico Explique las diferencias entre un hemiacetal y un glucósido.

9. Sabor a miel La fructosa de la miel se encuentra principalmente en la forma β-D-piranosa. Éste es uno de los glúcidos más dulces conocidos, unas dos veces más dulce que la glucosa. La forma β-D-furanosa de la fructosa es mucho menos dulce. El dulzor de la miel disminuye gradualmente a elevadas temperaturas. Además, los jarabes de cereales con alto contenido de fructosa (un producto comercial en el cual la mayor parte de la glucosa del jarabe de cereales se transforma en fructosa) se utilizan para endulzar las bebidas *frías*, pero no las *calientes*. ¿Qué propiedad química de la fructosa podría justificar ambas observaciones?



10. La glucosa oxidasa en la determinación de la glucosa en sangre El enzima glucosa oxidasa aislado a partir del hongo *Penicillium notatum* cataliza la oxidación de la β-D-glucosa a D-glucono-δ-lactona. Este enzima es altamente específico para el anómero β de la glucosa y no afecta al anómero α. A pesar de esta especificidad, la reacción catalizada por la glucosa oxidasa se usa normalmente en un ensayo clínico de determinación de glucosa total en sangre –en disoluciones que contienen una mezcla de β- y α-D-glucosa. ¿Cuáles son las circunstancias que permiten que esto sea posible? Además de permitir la detección de menores cantidades de glucosa, ¿qué ventaja ofrece la glucosa oxidasa sobre el reactivo de Fehling en la determinación de la glucosa en sangre?

11. La invertasa "invierte" la sacarosa Por dulce que sea la sacarosa, una mezcla equimolar de sus monosacáridos constituyentes, D-glucosa y D-fructosa, es más dulce. Además de aumentar el sabor dulce, la fructosa tiene propiedades higroscópicas que mejoran la textura de los alimentos, reduciendo la cristalización y aumentando la humedad.

En la industria alimentaria, la sacarosa hidrolizada se denomina azúcar invertido y el enzima de levadura que la hidroliza se denomina invertasa. La reacción hidrolítica se sigue generalmente midiendo la rotación específica de la solución, que es positiva (+66,4°) para la sacarosa, pero que se vuelve negativa (se invierte) a medida que se forma más D-glucosa (rotación específica = +52,7°) y D-fructosa (rotación específica = -92°).

Partiendo de lo que sabe sobre la química del enlace glucosídico, ¿cómo hidrolizaría sacarosa para invertir el azúcar de manera no enzimática en una cocina casera?

12. Fabricación de chocolates rellenos La fabricación de chocolates que contienen un relleno líquido es una aplicación interesante de la ingeniería enzimática. El relleno líquido está formado básicamente por una disolución acuosa de azúcares rica en fructosa que endulza su sabor. El dilema técnico es el siguiente: el recubrimiento de chocolate debe prepararse vertiendo chocolate fundido y caliente sobre un núcleo sólido (o casi sólido), y sin embargo el producto final debe tener un relleno líquido, rico en fructosa. Sugiera un modo de solucionar este problema. (Pista: La solubilidad de la sacarosa es mucho menor que la de una mezcla de glucosa y fructosa.)

13. ¿Anómeros de la sacarosa? A pesar de que la lactosa se presenta en dos formas anoméricas, no se han descrito formas anoméricas de la sacarosa. ¿Por qué?

14. Gentiobiosa La gentiobiosa (D-Glc(β1→6)D-Glc) es un disacárido que se encuentra en ciertos glucósidos vegetales. Escriba la estructura de la gentiobiosa basada en su nombre abreviado. ¿Es un azúcar reductor? ¿Experimenta mutarrotación?

15. Identificación de azúcares reductores ¿Es un azúcar reductor la *N*-acetil-β-D-glucosamina (Fig. 7-9)? ¿Y el D-gluconato? ¿Es un azúcar reductor el disacárido GlcN(α1⟷1α)Glc?

16. Digestión de la celulosa La celulosa podría constituir una forma muy asequible y barata de glucosa, pero los humanos no la pueden digerir. ¿Por qué no? Si se le ofreciese un procedimiento que le permitiese adquirir esta capacidad, ¿lo aceptaría? ¿Por qué sí o por qué no?

17. Propiedades físicas de la celulosa y el glucógeno La celulosa prácticamente pura obtenida a partir de los filamentos de la semilla de las plantas del género *Gossypium* (algodón) es resistente, fibrosa y completamente insoluble en agua. En cambio, el glucógeno obtenido a partir de músculo o hígado se solubiliza fácilmente en agua caliente dando lugar a una disolución turbia. A pesar de que presentan propiedades físicas marcadamente diferentes, ambas sustancias están compuestas por polímeros de D-glucosa, de masa molecular comparable, unidos por enlaces (1→4). ¿Cuáles son las características estructurales que hacen que estos dos polisacáridos difieran en sus propiedades físicas? Explique las ventajas biológicas de sus propiedades respectivas.

18. Dimensiones de un polisacárido Compare las dimensiones de una molécula de celulosa y una molécula de amilosa, cada una con M_r 200.000.

19. Velocidad de crecimiento del bambú Las cañas de bambú, una planta tropical, pueden crecer a la asombrosa velocidad de 0,3 m/día en condiciones óptimas. Debido a que las cañas se componen casi totalmente de fibras de celulosa orientadas en la dirección del crecimiento, calcule el número de residuos de azúcar por segundo que deben añadirse enzimáticamente a las cadenas de celulosa para justificar esta velocidad de crecimiento. Cada unidad de D-glucosa tiene una longitud aproximada de 0,5 nm una vez incorporada a la molécula de celulosa.

20. El glucógeno como material de reserva energética: ¿Durante cuánto tiempo es capaz de volar un ave de caza? Desde hace mucho tiempo, se ha observado que ciertas aves de caza tales como el urogallo, la codorniz y los faisanes se fatigan fácilmente. El historiador griego Jenofonte escribió: "Las avutardas... pueden ser capturadas si se las levanta con rapidez, puesto que son capaces de volar tan solo una corta distancia y, lo mismo que las perdices, se cansan enseguida; y su carne es deliciosa." Los músculos de las alas de las aves de caza dependen casi exclusivamente de la utilización de glucosa 1-fosfato como fuente de energía, en forma de ATP (Capítulo 14). La glucosa 1-fosfato se forma por degradación del glucógeno almacenado en el músculo, catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa. La velocidad de producción de ATP está limitada por la velocidad de degradación del glucógeno. Durante un "vuelo súbito", la velocidad de degradación del glucógeno en las aves de caza es bastante elevada, aproximadamente 120 μmol/min de glucosa 1-fosfato producida por gramo de tejido fresco. Considerando que los músculos de las alas generalmente contienen un 0,35% de glucógeno en peso, calcule durante cuánto tiempo puede volar un ave de caza. (Suponga una masa molecular media para un residuo de glucosa en el glucógeno de 162 g/mol).

21. Estabilidad relativa de dos confórmeros Explique por qué las dos estructuras que se muestran en la Figura 7-18b son tan diferentes energéticamente (estabilidad). Pista: Véase la Figura 1-23.

22. Volumen de sulfato de condroitina en disolución Una de las funciones más importantes del sulfato de condroitina es actuar como lubricante en las articulaciones óseas formando

un medio parecido a un gel, capaz de resistir la fricción y los impactos. Esta función parece estar relacionada con una propiedad característica del sulfato de condroitina: el volumen ocupado por la molécula es mucho mayor en disolución que cuando forma un sólido deshidratado. ¿Por qué el volumen ocupado por la molécula es mucho mayor en disolución?

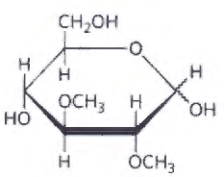
23. Interacciones de la heparina La heparina es un glucosaminoglucano cargado muy negativamente, que se utiliza clínicamente como anticoagulante. Actúa uniéndose a varias proteínas del plasma, incluida la antitrombina III que es un inhibidor de la coagulación sanguínea. Parece que la unión 1:1 de la heparina a la antitrombina III provoca un cambio conformacional en la proteína que incrementa mucho su capacidad para inhibir la coagulación. ¿Qué aminoácidos de la antitrombina III es probable que interaccionen con la heparina?

24. Permutaciones de un trisacárido Piense sobre cómo se podría calcular el número de trisacáridos posibles constituidos por *N*-acetilglucosamina 4-sulfato (GlcNAc4S) y ácido glucurónico (GlcA), y escriba 10 de ellos.

25. Efecto del ácido siálico sobre la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS Suponga que tiene cuatro formas de una proteína, todas ellas con secuencia de aminoácidos idéntica pero que contengan cero, uno, dos o tres cadenas oligosacáridas que terminan, cada una de ellas en un residuo de ácido siálico. Dibuje el patrón del gel esperado cuando se somete una mezcla de estas cuatro glucoproteínas a electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de SDS (véase la Fig. 3-18) y se tiñen con un reactivo de proteína. Identifique las bandas en su dibujo.

26. Contenido informativo de los oligosacáridos La porción de glúcido de algunas glucoproteínas puede servir de sitio de reconocimiento celular. Para ello, es necesario que los oligosacáridos de las glucoproteínas puedan adoptar una amplia variedad de formas. ¿Qué compuestos podrían dar lugar a una mayor variedad de estructuras: los oligopéptidos compuestos por cinco aminoácidos diferentes o los oligosacáridos compuestos por cinco monosacáridos diferentes? Justifique su respuesta.

27. Determinación del grado de ramificación de la amilopectina El grado de ramificación de la amilopectina (número de enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 6$)) se puede determinar mediante el siguiente procedimiento. Una muestra de amilopectina es tratada exhaustivamente con un agente metilante (yoduro de metilo) que reemplaza todos los hidrógenos de los grupos hidroxilo del azúcar por grupos metilo, convirtiendo los grupos —OH en grupos —OCH_3. Todos los enlaces glucosídicos de la muestra tratada se hidrolizan a continuación en una disolución acuosa ácida. Se determina la cantidad de 2,3-di-*O*-metilglucosa en la muestra hidrolizada.



2,3-Di-O-metilglucosa

(a) Explique en qué se basa el método de determinación del número de puntos de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 6$) de la amilopectina. ¿Qué sucede con los residuos de glucosa no ramificados de la amilopectina durante los procesos de metilación e hidrólisis?

(b) Una muestra de amilopectina de 258 mg tratada del modo descrito anteriormente dio un rendimiento de 12,4 mg de 2,3-di-*O*-metilglucosa. Determine cuál es el porcentaje de residuos de glucosa que contienen un enlace de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 6$). (Considere que la masa molecular de un residuo de glucosa en la amilopectina es 162 g/mol).

28. Análisis estructural de un polisacárido Se aisló un polisacárido de estructura desconocida y se sometió a un proceso de metilación exhaustiva y posterior hidrólisis. El análisis de los productos reveló la presencia de tres azúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glucosa, 2,4-di-*O*-metil-D-glucosa y 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucosa en una relación 20:1:1. ¿Cuál es la estructura del polisacárido?

Problema de análisis de datos

29. Determinación de la estructura de los antígenos del grupo sanguíneo ABO El sistema del grupo sanguíneo ABO humano se descubrió en 1901 y, en 1924, se demostró que este rasgo se heredaba en forma de un locus génico simple con tres alelos. En 1960, W.T.J. Morgan publicó un artículo en el que se resumía lo que se conocía en aquel momento sobre la estructura de las moléculas de antígeno ABO. Cuando se publicó el artículo no se conocían aún las estructuras completas de los antígenos A, B y O; este trabajo constituye un ejemplo del aspecto que tiene el conocimiento científico "en su formación".

En todo intento de determinar la estructura de un compuesto biológico desconocido los investigadores se enfrentan a dos problemas fundamentales: (1) si se desconoce lo que *ello* es, ¿cómo saber si *ello* es puro? (2) si no sabe lo que *ello* es, ¿cómo saber si las condiciones de extracción y purificación no han cambiado *su* estructura? Morgan enfocó el problema 1 mediante varios métodos. Uno de los métodos descritos en su artículo consiste en observar "valores analíticos constantes después de pruebas de solubilidad fraccional. En este caso los "valores analíticos" consisten en medidas de la composición química, punto de fusión y otros.

(a) Basándose en su conocimiento de las técnicas químicas ¿qué significaba para Morgan "pruebas de solubilidad fraccional"?

(b) ¿Por qué los valores analíticos obtenidos de las pruebas de solubilidad fraccional de una sustancia *pura* habían de ser constantes mientras que los de una sustancia *impura* no eran constantes?

Morgan se enfrontó al problema 2 utilizando un ensayo para medir la actividad inmunológica de la sustancia presente en diferentes muestras.

(c) ¿Por qué fue tan importante en los estudios de Morgan, especialmente en referencia al problema 2, que esta prueba de actividad fuese cuantitativa (medición del nivel de actividad) y no simplemente cualitativa (medir sólo la presencia o ausencia de una sustancia?

La estructura de los antígenos de grupo sanguíneo se muestra en la Figura 10-14. En su artículo, Morgan señaló varias propiedades de los tres antígenos A, B y O que se conocían en aquel momento:

1. El antígeno tipo B tiene un mayor contenido en galactosa que el A o el O.
2. El antígeno del tipo A contiene más aminoazúcares que el B o el O.
3. La razón glucosamina/galactosamina del antígeno A es aproximadamente de 1,2 mientras que para el B es aproximadamente 2,5.

(d)¿Cuál(es) de estos hallazgos es(son) consistente(s) con las estructuras conocidas de los antígenos de grupo sanguíneo?

(e)¿Cómo explica las discrepancias entre los datos de Morgan y las estructuras conocidas?

En trabajos posteriores, Morgan y sus colegas utilizaron una técnica ingeniosa para obtener información estructural acerca de los antígenos de grupo sanguíneo. Se habían encontrado enzimas que degradaban específicamente los antígenos. Sin embargo, estos enzimas sólo se podían obtener en forma de preparaciones enzimáticas crudas que quizás contenían más de un enzima de especificidad desconocida. La degradación de los antígenos de grupo sanguíneo por estos enzimas se podía inhibir mediante la adición de moléculas de azúcares particulares a la reacción. Sólo los azúcares encontrados en los antígenos de tipo sanguíneo podían producir la inhibición. Una preparación enzimática, aislada del protozoo *Trichomonas foetus*, degradaba los tres antígenos y era inhibido por la adición de ciertos azúcares. Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla siguiente, en la que se muestra el porcentaje de sustrato que permanecía intacto cuando el enzima de *T. foetus* actuaba sobre los antígenos de grupo sanguíneo en presencia de azúcares.

	Sustrato sin reaccionar (%)		
Azúcar añadido	**Antígeno A**	**Antígeno B**	**Antígeno O**
Control (sin azúcar)	3	1	1
L-Fucosa	3	1	100
D-Fucosa	3	1	1
L-Galactosa	3	1	3
D-Galactosa	6	100	1
N-Acetilglucosamina	3	1	1
N-Acetilgalactosamina	100	6	1

En el caso del antígeno O, la comparación entre el control y la L-fucosa muestra que la L-fucosa inhibe la degradación del antígeno. Esto constituye un ejemplo de inhibición por producto, en el que un exceso del producto de la reacción desplaza el equilibrio impidiendo que continúe la degradación del sustrato.

(f) Aunque el antígeno O contiene galactosa, *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina, ninguno de estos azúcares inhibió la degradación de este antígeno. Basándose en estos datos, la preparación enzimática de *T. foetus* ¿es una endo- o exoglucosidasa? (las endoglucosidasas rompen enlaces entre residuos del interior; las exoglucosidasas eliminan residuos uno a uno del extremo de un polímero). Explique su razonamiento.

(g) La fucosa también está presente en los antígenos A y B. Basándose en la estruturas de estos antígenos ¿por qué la fucosa no puede impedir su degradación por el enzima de *T. foetus*? ¿Qué estructura se produciría?

(h)¿Qué resultados en (f) y (g) están de acuerdo con las estructuras mostradas en la Figura 10-14? Explíquelo.

Referencia

Morgan W.T.J. 1960 The Croonian Lecture: a contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of bloodgroup specificity. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 151:308-347.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 8

Nucleótidos y ácidos nucleicos

Los medios para el autoaprendizaje que le ayudarán a practicar lo que ha aprendido y a consolidar los conceptos de este Capítulo se encuentran en www.macmillan.learling.com/LehningerBiochemistry7e.

8.1 Algunos conceptos básicos 281

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos 287

8.3 Química de los ácidos nucleicos 295

8.4 Otras funciones de los nucleótidos 311

Los nucleótidos desempeñan una amplia variedad de funciones en el metabolismo celular. Garantizan los intercambios energéticos, actúan como señales químicas en los sistemas celulares en respuesta a hormonas y otros estímulos extracelulares y son también componentes estructurales de una serie de cofactores enzimáticos e intermediarios metabólicos. Por último, aunque no menos importante, son los constituyentes de los ácidos nucleicos: **ácido desoxirribonucleico (DNA)** y **ácido ribonucleico (RNA),** que son los depositarios moleculares de la información genética. La estructura de todas las proteínas, y en último término de todas las biomoléculas y de cada uno de los componentes celulares, es producto de la información programada en la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos celulares (o virales). La capacidad de almacenar y transmitir información genética de una generación a la siguiente es un requisito esencial para la vida.

Este capítulo ofrece una visión general de la naturaleza química de los nucleótidos y los ácidos nucleicos presentes en las células. En la Parte III examinaremos más detalladamente la función de los ácidos nucleicos.

8.1 Algunos conceptos básicos

En la secuencia nucleotídica del DNA celular se encuentran especificadas las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas y las secuencias de nucleótidos de todas las moléculas de RNA de la célula. Un segmento de DNA que contenga la información necesaria para la síntesis de un producto biológico funcional, se trate de una proteína o de un RNA, recibe el nombre de **gen**. Una célula comúnmente posee muchos miles de genes y, por tanto, no resulta sorprendente que las moléculas de DNA suelan ser muy grandes. Las únicas funciones conocidas del DNA son el almacenamiento y la transmisión de la información biológica.

En la célula se encuentran varias clases de RNA, que cubren una más amplia variedad de funciones. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** son componentes de los ribosomas, complejos que llevan a cabo la síntesis de proteínas. Los **RNA mensajeros (mRNA)** actúan de intermediarios, transportando la información genética desde un gen o unos pocos genes hasta el ribosoma, donde se sintetizan las correspondientes proteínas. Los **RNA de trasferencia (tRNA)** son moléculas adaptadoras que traducen con fidelidad la información contenida en el mRNA a secuencias específicas de aminoácidos. Además de estas clases principales, hay una amplia variedad de RNA que desempeñan funciones específicas, descritas en profundidad en la Parte III.

Los nucleótidos y los ácidos nucleicos contienen bases y pentosas características

Los **nucleótidos** están formados por tres componentes característicos: (1) una base nitrogenada (que contiene nitrógeno), (2) una pentosa y (3) uno o más fosfatos **(Fig. 8-1)**. La molécula sin el grupo fosfato se denomina **nucleósido**. Las bases nitrogenadas son derivados de dos compuestos parentales, **pirimidina** y **purina**. Las bases y las pentosas de los nucleótidos comunes son compuestos heterocíclicos.

›› **Convención clave:** Los átomos de carbono y de nitrógeno de las estructuras parentales se numeran convencionalmente con el fin de facilitar la nomenclatura y la identificación de sus muchos derivados. Las convenciones adoptadas para los anillos de pentosa siguen las reglas indicadas en el Capítulo 7, pero a los números de los átomos de carbono de las pentosas de los nucleótidos y nucleósidos se les añade el símbolo prima (') para distinguirlos de los átomos numerados de las bases nitrogenadas.‹‹

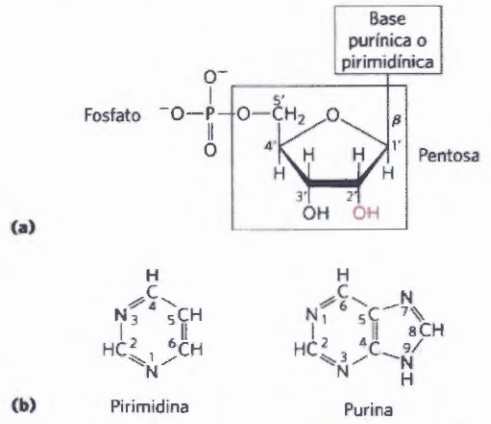


FIGURA 8-1 Estructura de los nucleótidos. **(a)** Estructura general de los nucleótidos con la numeración convencional del anillo de la pentosa. Se muestra la estructura de un ribonucleótido. En los desoxirribonucleótidos un -H reemplaza al grupo -OH del carbono 2' (en rojo). **(b)** Los compuestos parentales de los que derivan las bases purínicas y pirimidínicas de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, con especificación de las convenciones para la numeración.

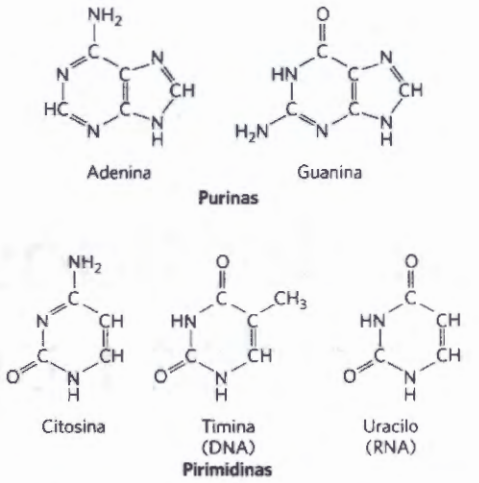


FIGURA 8-2 Principales bases purínicas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos. Algunos de los nombres comunes de estos compuestos reflejan las circunstancias de su descubrimiento. La guanina, por ejemplo, se aisló por vez primera del guano (estiércol de aves) y la timina se aisló por primera vez de tejido del timo.

La base de un nucleótido está unida covalentemente (a través del N-1 en las pirimidinas y el N-9 en las purinas) mediante un enlace *N*-β-glucosídico con el carbono 1' de la pentosa, y el fosfato está esterificado con el carbono 5'. El enlace *N*-β-glucosídico se forma por eliminación de agua (un grupo hidroxilo de la pentosa y un hidrógeno de la base), como en la formación de los enlaces *O*-glucosídicos (véase la Fig. 7-30).

Tanto el DNA como el RNA contienen dos bases purínicas principales, la **adenina** (A) y la **guanina** (G), y dos bases pirimidínicas principales. Tanto en el DNA como el RNA una de las pirimidinas es la **citosina** (C), pero la segunda base pirimidínica es **timina** (T) en el DNA y **uracilo** (U) en el RNA. Sólo raramente se encuentra timina en el RNA o uracilo en el DNA. En la **Figura 8-2** se muestran las estructuras de las cinco bases principales y en la Tabla 8-1 se resume la nomenclatura de sus correspondientes nucleótidos y nucleósidos.

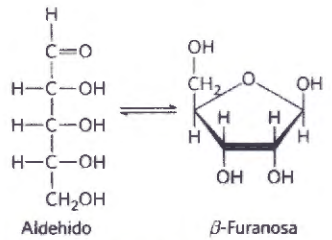
Los ácidos nucleicos contienen dos tipos de pentosas. Los desoxirribonucleótidos del DNA contienen 2'-desoxi-D-ribosa, y los ribonucleótidos del RNA contienen D-ribosa. En los nucleótidos, ambos tipos de pentosa se encuentran en la forma β-furanosa (anillo pentagonal cerrado). Tal como muestra la **Figura 8-3**, el anillo de la pentosa no es plano, sino que presenta diversas conformaciones, designadas generalmente como formas "ahuecadas".

›› Convención clave: Aunque son dos los aspectos que distinguen el DNA del RNA –diferentes pentosas y la presencia de uracilo en el RNA y de timina en el DNA– son las pentosas las que definen la identidad de un ácido nucleico. Si el ácido nucleico contiene 2'-desoxi-D-ribosa es DNA por definición aunque pueda contener uracilo. Del mismo modo, si el ácido nucleico contiene D-ribosa, es RNA con independencia de su composición en bases. **‹‹**

TABLA 8-1 Nomenclatura de los nucleótidos y los ácidos nucleicos

Base	Nucleósido	Nucleótido	Ácido nucleico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilato	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina o desoxitimidina	Timidilato o desoxitimidilato	DNA
Uracilo	Uridina	uridilato	RNA

Nota: "Nucleósido" y "nucleótido" son términos genéricos que incluyen tanto las formas ribo- como las desoxirribo-. Tanto los ribonucleósidos como los ribonucleótidos se designan aquí simplemente como nucleósidos y nucleótidos (p.ej., la riboadenosina se denomina adenosina) y los desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos como desoxinucleósidos y desoxinucleótidos (p.ej. la desoxirriboadenosina se denomina desoxiadenosina). Ambas nomenclaturas son aceptables, pero se utilizan más comúnmente las denominaciones más cortas. La timina es una excepción; se utiliza el nombre "ribotimidina" para poner de manifiesto su presencia poco habitual en el RNA.



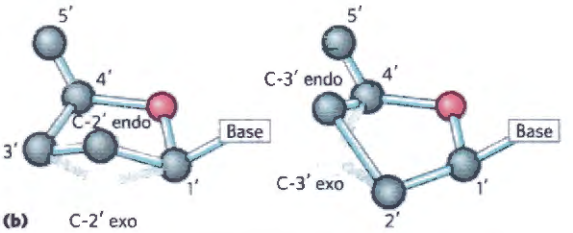


FIGURA 8-3 Conformaciones de la ribosa. **(a)** En disolución, las formas lineal (aldehído) y cíclica (β-furanosa) de la ribosa libre están en equilibrio. El RNA contiene únicamente la forma cíclica, β-D-ribofuranosa. La desoxirribosa sufre una interconversión similar en disolución, pero en el DNA sólo se encuentra como β-2′-desoxi-D-ribofuranosa. **(b)** Los anillos de ribofuranosa pueden existir en los nucleótidos en cuatro conformaciones distintas. En todos los casos, cuatro de los cinco átomos están prácticamente en un solo plano. El quinto átomo (C-2′ o C-3′) se encuentra en el mismo lado (endo) o en el lado opuesto (exo) del plano que el átomo C-5′.

La **Figura 8-4** muestra las estructuras y los nombres de los cuatro **desoxirribonucleótidos** principales (desoxirribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales del DNA, y los cuatro **ribonucleótidos** principales (ribonucleósidos 5′-monofosfato), las unidades estructurales de los RNA.

Aunque la mayoría de nucleótidos contienen solamente las purinas y pirimidinas principales, tanto el DNA como el RNA contienen también otras bases secundarias o minoritarias **(Fig. 8-5)**. En el DNA, las más comunes de éstas son las formas metiladas de las bases principales; en algunos DNA víricos, ciertas bases

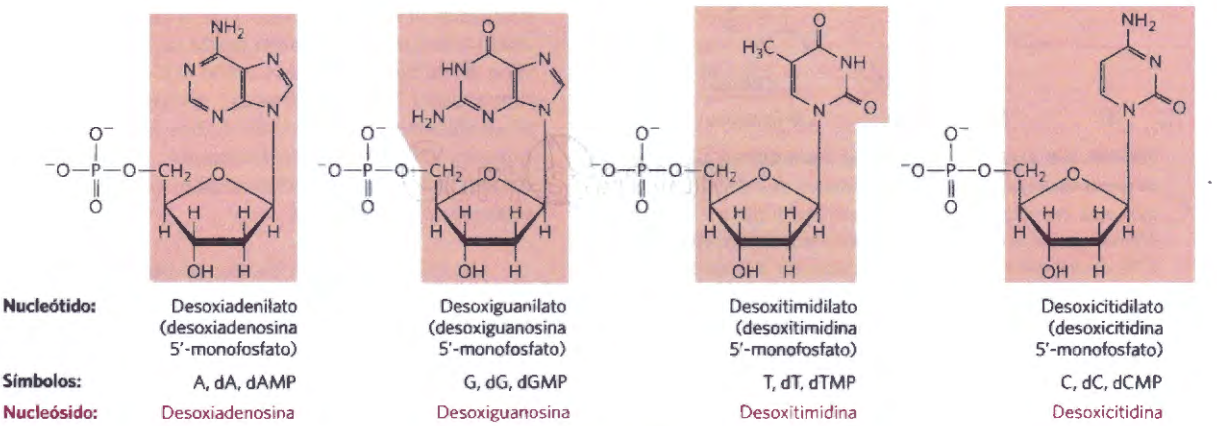


FIGURA 8-4 Desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos de los ácidos nucleicos. Todos los nucleótidos se muestran en su forma libre a pH 7,0. Las unidades nucleotídicas del DNA **(a)** suelen simbolizarse por A, G, T y C, y en ocasiones por dA, dG, dT y dC; las del RNA **(b)** por A, G, U y C. En su forma libre, los desoxirribonucleótidos se suelen abreviar como dAMP, dGMP, dTMP y dCMP; los ribonucleótidos, como AMP, GMP, UMP y CMP. En cada nucleótido de la figura, el nombre más común va seguido por el nombre completo entre paréntesis. Todas las abreviaturas suponen que el grupo fosfato se encuentra en posición 5′. La parte nucleosídica de cada molécula está sombreada de rosa. En esta ilustración y en las siguientes no se muestran los carbonos del anillo.

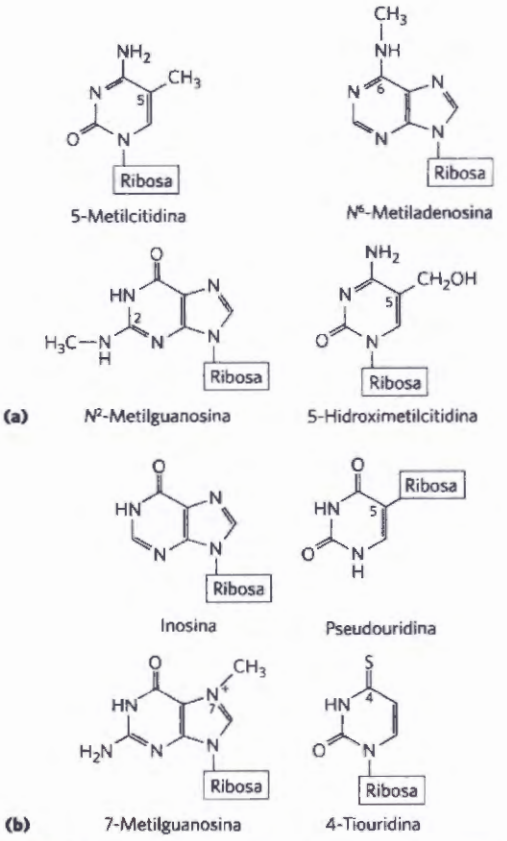


FIGURA 8-5 Algunas bases purínicas y pirimidínicas secundarias en su forma nucleosídica. **(a)** Bases minoritarias en el DNA. La 5-metilcitidina está presente en el DNA de animales y plantas superiores, la N^6-metiladenosina en el DNA bacteriano y la 5-hidroximetilcitidina en el DNA de animales y de bacterias infectadas por diversos bacteriófagos. **(b)** Algunas bases minoritarias presentes en los tRNA. La inosina contiene la base hipoxantina. Obsérvese que la pseudouridina, al igual que la uridina, contiene uracilo; se distinguen por el punto de unión a la ribosa: en la uridina, el uracilo se une por N-1, el punto de unión normal para las pirimidinas, mientras que en el pseudouracilo se une a través del C-5.

puedan estar hidroximetiladas o glucosiladas. Las bases alteradas o poco comunes del DNA sirven a menudo como señales específicas para la regulación o la protección de la información genética. En el RNA, y en especial en el tRNA, se encuentran también bases secundarias de muchos tipos (véase la Fig. 8-25 y la Fig. 26-22).

» **Convención clave:** La nomenclatura de las bases secundarias puede resultar confusa. Muchas tienen nombres comunes, al igual que las bases principales, como, por ejemplo, la hipoxantina, cuyo nucleósido, inosina, se muestra en la Figura 8-5. Para las formas sustituidas de estas bases, cuando la sustitución tiene lugar en un átomo de los anillos de purina o pirimidina, la convención más habitual (la utilizada aquí) consiste simplemente en indicar la posición en el anillo donde se ha producido la sustitución: por ejemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina y 5-hidroximetilcitosina (mostradas en su forma nucleosídica en la Fig. 8-5). El elemento (N, C, O) al cual está unido el sustituyente no se especifica. La convención cambia cuando el átomo sustituido es exocíclico (no incluido en el anillo), en cuyo caso se

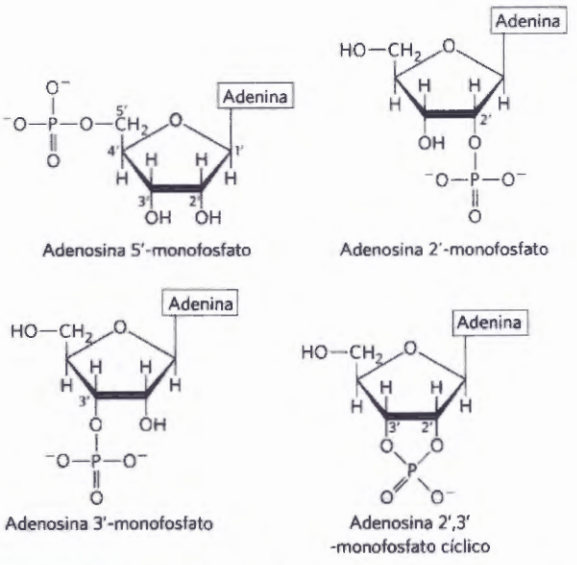


FIGURA 8-6 Algunos monofosfatos de adenosina. Adenosina 2'-monofosfato, 3'-monofosfato, y 2',3'-monofosfato cíclico, compuestos intermedios de la hidrólisis enzimática y alcalina del RNA.

identifica el tipo de átomo y se indica la posición del anillo a la que se encuentra unido mediante un superíndice. El nitrógeno amínico unido al C-6 de la adenina se denominará N^6; análogamente, el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amínico en C-6 y C-2 de la guanina se denominarán O^6 y N^2, respectivamente. Ejemplos de esta nomenclatura son la N^6-metiladenosina y la N^2-metilguanosina (Fig. 8-5). «

Las células también contienen nucleótidos con grupos fosfato en posiciones diferentes del carbono 5' **(Fig. 8-6)**. Los **ribonucleósidos 2',3'-monofosfato cíclicos** son intermediarios aislables y los **ribonucleósidos 3'-monofosfato** son productos finales de la hidrólisis del RNA por ciertas ribonucleasas. Otros ejemplos son la adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) y la guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), que se comentan al final de este capítulo.

Los nucleótidos sucesivos de los ácidos nucleicos están unidos por enlaces fosfodiéster

Los nucleótidos sucesivos tanto del DNA como del RNA están unidos covalentemente mediante "puentes" de grupos fosfato, en los que el grupo fosfato en 5' de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo en 3' del nucleótido siguiente mediante un **enlace fosfodiéster (Fig. 8-7)**. Por tanto, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en residuos alternados de fosfato y pentosa, mientras que las bases pueden considerarse como grupos laterales unidos al esqueleto a intervalos regulares. Los esqueletos covalentes del DNA y el RNA son hidrofílicos. Los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar forman enlaces de hidrógeno con el agua. Los grupos fosfato, con un pK_a cercano a 0, se encuentran completamente ionizados y cargados negativamente a pH 7, y las cargas negativas se encuentran generalmente neutralizadas por interacciones iónicas con cargas positivas de proteínas, iones metálicos o poliaminas.

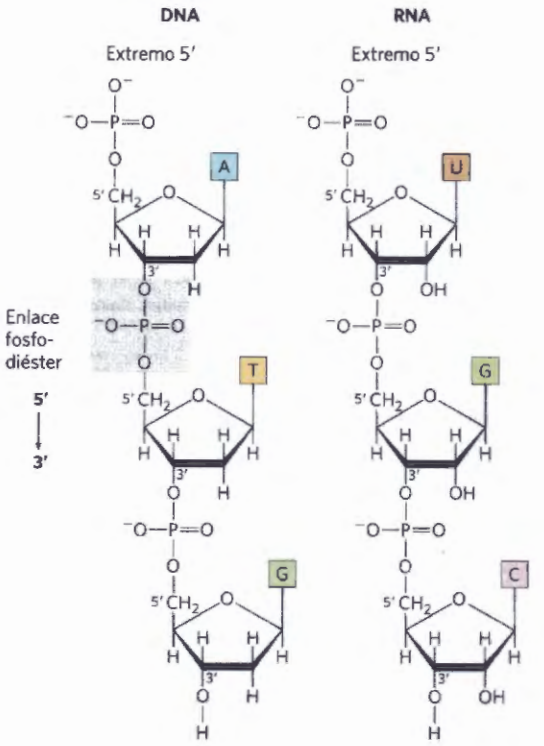
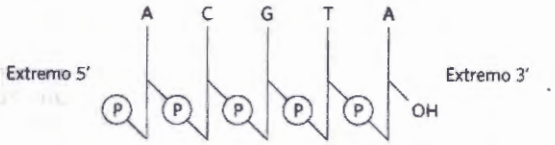


FIGURA 8-7 Enlaces fosfodiéster del esqueleto covalente del DNA y el RNA. Los enlaces fosfodiéster (uno de los cuales está sombreado en el DNA) unen los nucleótidos sucesivos. El esqueleto de pentosas y grupos fosfato alternados en ambos tipos de ácido nucleico es muy polar. Los extremos 5' y 3' de la macromolécula pueden encontrarse libres o pueden estar unidos a un grupo fosforilo.

›› **Convención clave:** Todos los enlaces fosfodiéster en el DNA y el RNA tienen la misma orientación a lo largo de la cadena (Fig. 8-7), con lo cual cada cadena lineal de ácido nucleico tiene una polaridad específica y extremos 5' y 3' diferenciados. Por definición, el **extremo 5'** carece de nucleótido en posición 5', mientras que el **extremo 3'** carece de nucleótido en posición 3'. Otros grupos (con frecuencia uno o más grupos fosfato) pueden estar presentes en uno o en ambos extremos. La orientación 5' a 3' de una cadena de ácido nucleico se refiere a los *extremos* de la cadena, no a la orientación de los enlaces fosfodiéster individuales que unen los nucleótidos que la forman. ‹‹

El esqueleto covalente del DNA y el RNA experimenta una lenta hidrólisis no enzimática de los enlaces fosfodiéster. Al contrario del DNA, el RNA in vitro se hidroliza rápidamente en condiciones alcalinas; los grupos hidroxilo en 2' del RNA (ausentes en el DNA) están directamente implicados en el proceso. Los primeros productos de la acción del álcali sobre el RNA son nucleótidos 2',3'-monofosfato cíclicos, los cuales son rápidamente hidrolizados para producir una mezcla de 2'- y 3'-nucleósidos monofosfato **(Fig. 8-8)**.

Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos pueden representarse esquemáticamente, tal como se ilustra a continuación para un segmento de DNA de cinco nucleótidos. Los grupos fosfato se representan con el símbolo Ⓟ, y cada una de las desoxirribosas mediante una línea vertical que va del C-1' en la parte superior de la línea vertical al C-5' en la inferior (recuerde, sin embargo, que en los ácidos nucleicos el azúcar se encuentra siempre en su forma de anillo cerrado, β-furanosa). Las líneas que conectan nucleótidos (que pasan a través de Ⓟ) se dibujan uniendo en diagonal el punto medio (C-3') de la desoxirribosa de un nucleótido con el extremo inferior (C-5') del siguiente.



Otras representaciones más sencillas de este pentanucleótido son: pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA y pACGTA.

›› **Convención clave:** la secuencia de una cadena sencilla de ácido nucleico se escribe siempre con el extremo 5' a la izquierda y el 3' a la derecha; es decir, en la dirección 5'→3'. ‹‹

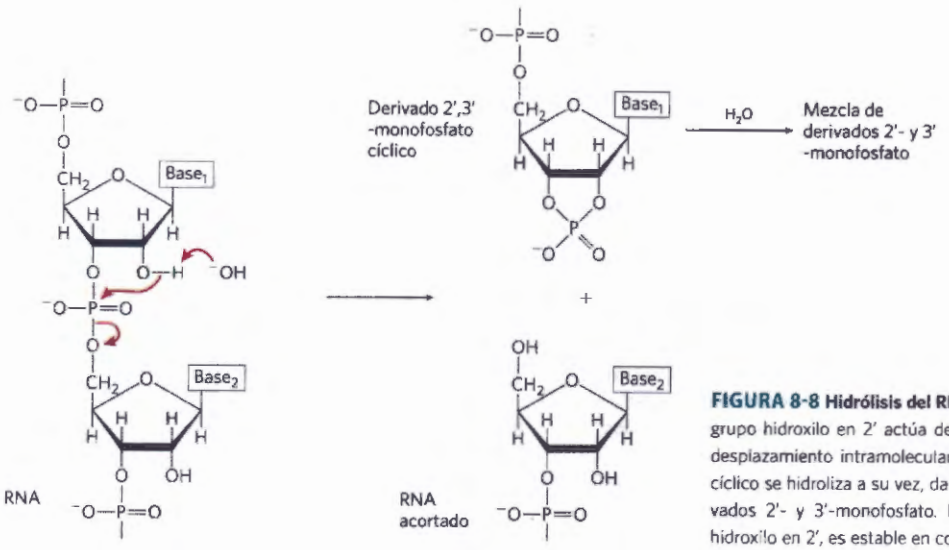


FIGURA 8-8 Hidrólisis del RNA en condiciones alcalinas. El grupo hidroxilo en 2' actúa de nucleófilo en una reacción de desplazamiento intramolecular. El derivado 2',3'-monofosfato cíclico se hidroliza a su vez, dando lugar a una mezcla de derivados 2'- y 3'-monofosfato. El DNA, que carece de grupo hidroxilo en 2', es estable en condiciones similares.

Un ácido nucleico corto se denomina **oligonucleótido**. El calificativo de "corto" es en cierta medida arbitrario, aunque el término oligonucleótido se utiliza a menudo para polímeros de hasta 50 nucleótidos. Los ácidos nucleicos de mayor longitud se denominan **polinucleótidos**.

Las propiedades de las bases de los nucleótidos influyen en la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos

Las pirimidinas y purinas libres son compuestos débilmente básicos y por ello se denominan bases. Las purinas y pirimidinas presentes en el DNA y el RNA son moléculas aromáticas (Fig. 8-2). Esta propiedad tiene efectos importantes sobre la estructura, la distribución electrónica y la capacidad de absorción de la luz por los ácidos nucleicos. La deslocalización de los electrones entre los átomos del anillo confiere a la mayoría de los enlaces el carácter de doble enlace parcial. En consecuencia, las pirimidinas son moléculas planas y las purinas casi planas, con una ligera deformación. Las bases purínicas y pirimidínicas pueden existir en dos o más formas tautoméricas según el pH. Por ejemplo, el uracilo se presenta en las formas de lactama, lactima y doble lactima **(Fig. 8-9)**. Las estructuras mostradas en la Figura 8-2 son los tautómeros predominantes a pH 7,0. Todas las bases nucleotídicas absorben luz UV, y los ácidos nucleicos se caracterizan por una fuerte absorción a longitudes de onda cercanas a 260 nm **(Fig. 8-10)**.

Las bases purínicas y pirimidínicas son hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua en el pH celular cercano a la neutralidad. A pH ácido o alcalino las bases adquieren carga y aumenta su solubilidad en agua. Las interacciones hidrofóbicas de apilamiento, que sitúan paralelamente los planos de los anillos de dos o más bases (de forma análoga a una pila de monedas) es uno de los dos tipos principales de interacción entre las bases. El apilamiento también involucra una combinación de interacciones de van der Waals y dipolo-dipolo entre las bases. El apilamiento de las bases ayuda a minimizar el contacto de las bases con el agua y es de gran importancia en la estabilización de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, como describiremos más adelante.

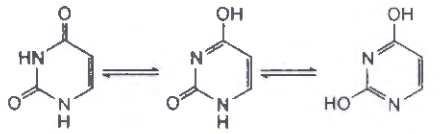


FIGURA 8-9 Formas tautoméricas del uracilo. A pH 7,0, predomina la forma lactama; las otras formas adquieren más importancia al disminuir el pH. Las otras pirimidinas libres y las purinas libres también poseen formas tautoméricas, pero son mucho menos abundantes.

Los grupos funcionales de las purinas y pirimidinas son los grupos carbonilo, los átomos de nitrógeno del anillo y los grupos amino exocíclicos. La formación de enlaces de hidrógeno, en los que participan los grupos amino y carbonilo, constituye el tipo principal de interacción entre dos (y en ocasiones tres o cuatro) cadenas complementarias de ácido nucleico. Los patrones de enlaces de hidrógeno más frecuentes fueron definidos por James Watson y Francis Crick en 1953; en éstos, la A se une específicamente con la T (o U) y la G se une con la C **(Fig. 8-11)**. Estos dos tipos de **pares de bases** predominan en el DNA y el RNA de doble cadena, y los tautómeros que se muestran en la Figura 8-2 son los responsables de estos patrones de apareamiento. Este apareamiento específico de las bases permite la duplicación de la información genética, como discutiremos más adelante en este capítulo.



James D. Watson
[Fuente: UPI/Bettmann/Corbis.]



Francis Crick, 1916-2004
[Fuente: UPI/Bettmann/Corbis.]

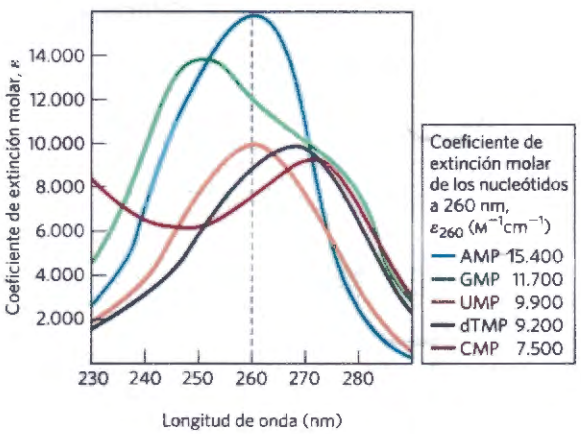


FIGURA 8-10 Espectros de absorción de los nucleótidos comunes. Los espectros se muestran como la variación del coeficiente de extinción molar con la longitud de onda. Los coeficientes de extinción molar a 260 nm y pH 7,0 (ε_{260}) se muestran en la tabla. Los espectros de los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos correspondientes, así como los de los nucleósidos, son esencialmente idénticos. Para las mezclas de nucleótidos se utiliza la longitud de onda de 260 nm (línea discontinua vertical) para las medidas de absorción.

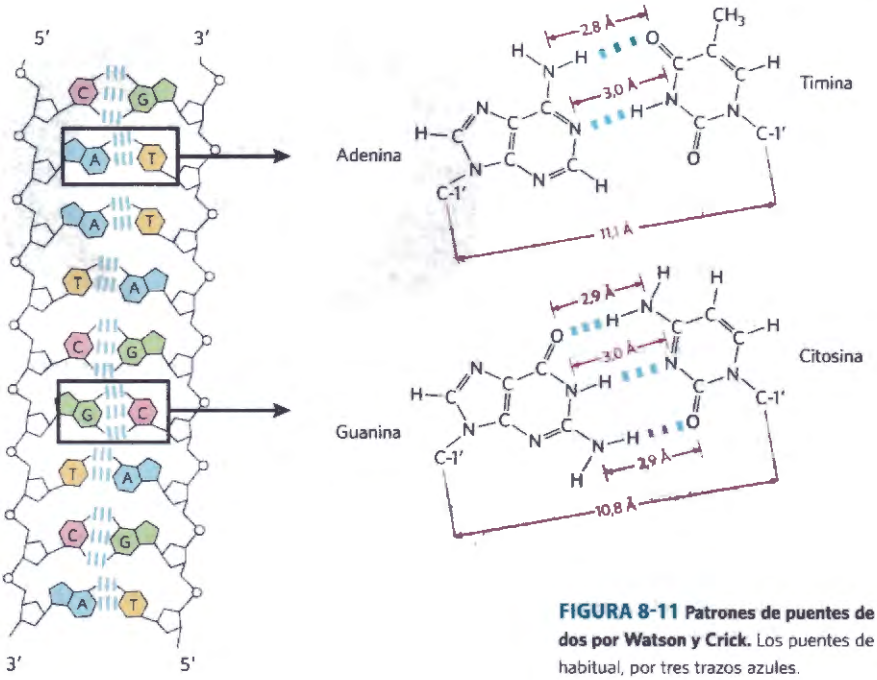


FIGURA 8-11 Patrones de puentes de hidrógeno de los pares de bases definidos por Watson y Crick. Los puentes de hidrógeno están representados, como es habitual, por tres trazos azules.

RESUMEN 8.1 Conceptos básicos

- Un nucleótido consiste en una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar pentosa y uno o más grupos fosfato. Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster entre el grupo 5'-hidroxilo de una pentosa y el grupo 3'-hidroxilo del siguiente.
- Hay dos tipos de ácidos nucleicos: RNA y DNA. Los nucleótidos del RNA contienen ribosa y las bases pirimidínicas comunes son el uracilo y la citosina. En el DNA los nucleótidos contienen 2'-desoxirribosa y las bases pirimidínicas comunes son la timina y la citosina. Las purinas primarias son la adenina y la guanina tanto en el RNA como en el DNA.

8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

El descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick en 1953 dio lugar a disciplinas completamente nuevas y repercutió en el curso de otras muchas ya establecidas. En este apartado nos centraremos en la estructura del DNA, en algunos pormenores de su descubrimiento y presentaremos los avances más recientes sobre el DNA. También describiremos la estructura del RNA.

Como en el caso de la estructura de las proteínas (Capítulo 4), puede resultar de utilidad describir la estructura de los ácidos nucleicos en términos de niveles de complejidad jerarquizados (estructura primaria, secundaria, terciaria). La estructura primaria de un ácido nucleico está definida por su estructura covalente y su secuencia de nucleótidos. Cualquier estructura regular y estable adoptada por algunos o por todos los nucleótidos de un ácido nucleico puede ser considerada como estructura secundaria. Todas las estructuras descritas en el resto de este capítulo pueden englobarse bajo el epígrafe de estructura secundaria. En general, se considera estructura terciaria el plegamiento complejo de los grandes cromosomas en la cromatina eucariótica y en el nucleoide bacteriano o el elaborado plegamiento de las grandes moléculas de tRNA o rRNA. La estructura terciaria del DNA se trata en el Capítulo 24 y la estructura terciaria del RNA se describe en el Capítulo 26.

El DNA es una doble hélice que almacena información genética

El DNA fue aislado y caracterizado por primera vez por Friedrich Miescher en 1868. A esta sustancia que contenía fósforo la denominó "nucleína". Hasta la década de 1940 con los trabajos de Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty no hubo pruebas fehacientes de que el DNA fuese el material genético. Avery y colaboradores mostraron que el DNA extraído de una cepa virulenta (causante de enfermedad) de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* e inyectada en una cepa no virulenta de este mismo organismo, era capaz de transformar la cepa no virulenta en una cepa virulenta. Ello les llevó a la conclusión de que el DNA extraído de la cepa virulenta transportaba el mensaje genético de la virulencia. En 1952, los experimentos de Alfred D. Hershey y Martha Chase, en los cuales estudiaron la infección de células bacterianas por un virus (bacteriófago), con el DNA o la proteína marcados radiactivamente, eliminaron cualquier duda de que el DNA, y no la proteína, transportase la información genética.

Otro elemento de gran importancia en el descubrimiento de la estructura del DNA fue el trabajo de Erwin Chargaff y colaboradores a finales de la década de 1940. Encontraron que las cantidades relativas de las cuatro bases de los nucleótidos del DNA variaban según el organismo, y que las cantidades relativas de ciertas bases eran prácticamente equivalentes. Estos datos, obtenidos a partir de los DNA de un gran número de especies diferentes, permitieron a Chargaff llegar a las siguientes conclusiones:

1. La composición en bases del DNA generalmente varía de una especie a otra.
2. Las muestras de DNA aisladas a partir de tejidos diferentes de la misma especie tienen la misma composición en bases.
3. La composición en bases del DNA de una determinada especie no varía con la edad del organismo, ni con su estado nutricional, ni con las variaciones ambientales.
4. En todos los DNA celulares, independientemente de la especie, el número de residuos de adenosina es igual al de residuos de timidina (es decir, A = T), y el número de residuos de guanosina es igual al número de residuos de citidina (G = C). A partir de estas relaciones se deduce que la suma de los residuos de purina es igual a la suma de los residuos de pirimidina; es decir, A + G = T + C.

Estas relaciones cuantitativas, a veces denominadas "reglas de Chargaff", fueron confirmadas posteriormente por muchos investigadores. Fueron esenciales para la deducción de la estructura tridimensional del DNA y dieron pistas sobre cómo la información genética está codificada en el DNA y se transmite de generación en generación.

Con el fin de estudiar más a fondo la estructura del DNA, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins utilizaron el poderoso método de la difracción de rayos X (véase el Recuadro 4-5), para analizar fibras de DNA. A principios de la década de 1950 demostraron que el DNA produce un diagrama de difracción de rayos X característico **(Fig. 8-12)**. El análisis de los diagramas permitió deducir que las moléculas del DNA son helicoidales, con dos periodicidades a lo largo del eje longitudinal, una primaria de 3,4 Å y otra secundaria de 34 Å. El problema consistía, pues, en la construcción de un modelo tridimensional de la molécula de DNA que pudiera explicar no sólo los datos de difracción de rayos X, sino también las equivalencias específicas entre bases, A = T y G = C, descubiertas por Chargaff, así como otras propiedades químicas del DNA.

James Watson y Francis Crick se basaron en esta información acumulada sobre el DNA para intentar deducir su estructura. En 1953 propusieron un modelo tridimensional para la estructura del DNA que tenía en cuenta todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales enrolladas alrededor del mismo eje, formando una doble hélice dextrógira (en el Recuadro 4-1 se describen las estructuras helicoidales dextrógiras y levógiras). Las cadenas hidrofílicas formadas por la desoxirribosa y los grupos fosfato alternados se encuentran en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. El anillo furanosa de cada desoxirribosa adopta la conformación C-2' endo. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo, hidrofóbicas y prácticamente planas, situadas a muy corta distancia unas de otras y en posición perpendicular al eje longitudinal de la hélice. La relación espacial de las dos cadenas da lugar a la formación de un **surco mayor** y un **surco menor** en la superficie de la doble hélice **(Fig. 8-13)**. Cada base de un nucleótido de una cadena está apareada en el mismo plano con una base de la otra cadena. Watson y Crick encontraron que los pares de bases unidos por enlaces

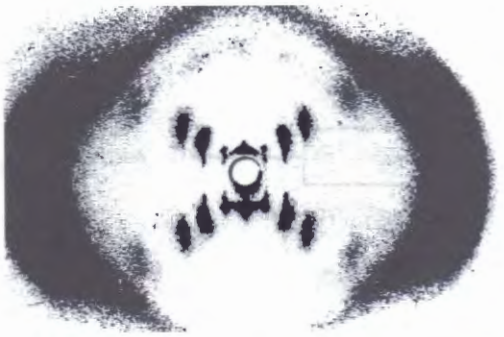


FIGURA 8-12 Diagrama de difracción de rayos X del DNA. Las manchas centrales en forma de cruz revelan la presencia de una estructura en hélice. Las bandas más intensas a la derecha y a la izquierda corresponden a la repetición de bases.

de hidrógeno, que se ilustran en la Figura 8-11, G con C y A con T, eran los que mejor encajaban en la estructura, proporcionando así una explicación para la regla de Chargaff, según la cual en todos los DNA, G≡C y A=T. Es importante observar que se pueden formar tres enlaces de hidrógeno entre G y C, simbolizados por G ≡ C, mientras que solamente se pueden formar dos entre A y T, simbolizados por A=T. Esta es una de las razones de la mayor dificultad para separar las hebras apareadas del DNA cuanto mayor sea la relación de pares de bases G≡C con respecto a los A=T. Otros apareamientos diferentes tienden, en mayor o menor medida, a desestabilizar la estructura en doble hélice.

Cuando Watson y Crick construyeron su modelo tuvieron que decidir desde el principio si las hebras del DNA debían ser **paralelas** o **antiparalelas**, es decir si sus enlaces 3', 5'-fosfodiéster debían tener la misma dirección o bien direcciones opuestas. La disposición antiparalela proporcionó el modelo más satisfactorio. Trabajos posteriores con DNA polimerasas (Capítulo 25) aportaron argumentos experimentales a favor de que las hebras eran efectivamente antiparalelas, conclusión que fue definitivamente confirmada por análisis de difracción de rayos X.

Con el fin de explicar las periodicidades observadas en el diagrama de difracción de rayos X de fibras de DNA, Watson y Crick construyeron diversos modelos moleculares hasta llegar a una estructura con las bases apiladas verticalmente en el interior de la doble hélice y separadas por una distancia de 3,4 Å; la repetición secundaria de unos 34 Å fue tenida en cuenta con la incorporación de 10 pares de bases en cada vuelta com-



Rosalind Franklin, 1920–1958
[Fuente: Science Source.]



Maurice Wilkins, 1916–2004
[Fuente: UPI/Bettmann/Corbis.]

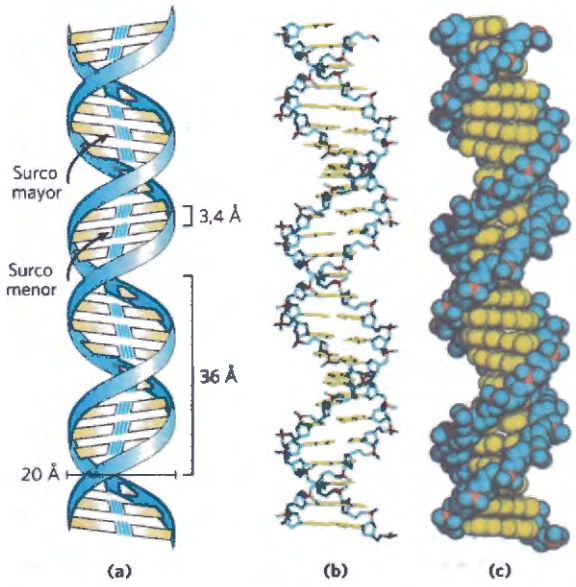


FIGURA 8-13 Modelo de Watson y Crick de la estructura del DNA. El modelo original propuesto por Watson y Crick tenía 10 pares de bases por vuelta y 34 Å (3,4 nm) por vuelta de hélice. Mediciones posteriores han mostrado que hay 10,5 pares de bases por vuelta y 36 Å (3,6 nm) por vuelta. **(a)** Representación esquemática que muestra las dimensiones de la hélice. **(b)** Modelo de varillas que muestra el esqueleto covalente y el apilamiento de las bases. **(c)** Modelo espacial de esferas.

pleta de la doble hélice. En disolución acuosa, la estructura es ligeramente diferente de la encontrada en las fibras y posee 10,5 pares de bases por vuelta (Fig. 8-13).

Como puede observarse en la **Figura 8-14**, las dos cadenas polinucleotídicas antiparalelas del DNA de doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición. En cambio, son **complementarias** entre sí. Siempre que haya adenina en una cadena, se encontrará timina en la otra; del mismo modo, la presencia de guanina en una cadena implica la presencia de citosina en la otra. La doble hélice o el dúplex del DNA se mantiene unido por enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias (Fig. 8-11) y por las interacciones de apilamiento de las bases. La complementariedad de las hebras del DNA se debe a los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases, sin embargo los enlaces de hidrógeno no contribuyen significativamente a la estabilidad de la estructura. La doble hélice está estabilizada principalmente por cationes metálicos, que apantallan las cargas negativas de los fosfatos, y por las interacciones de apilamiento de las bases complementarias. Las interacciones de apilamiento entre pares G≡C son más fuertes que las de los pares A=T adyacentes, incluyendo las cuatro bases. Por ello los duplex con mayor contenido en G≡C son más estables.

Las características importantes del modelo del DNA en doble hélice están apoyadas por un gran número de resultados de tipo químico y biológico. Además, el propio modelo sugirió de inmediato un mecanismo para la transmisión de la información genética. La característica fundamental del modelo es la complementariedad de las dos hebras del DNA. Watson y Crick comprendieron, mucho antes de disponer de pruebas experimentales en su favor, que la replicación de la estructura podía tener

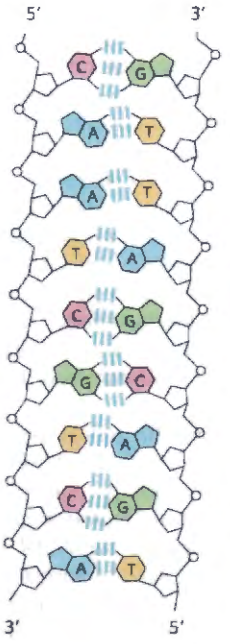


FIGURA 8-14 Complementaridad de las hebras en el DNA de doble hélice. Las cadenas antiparalelas complementarias del DNA siguen las reglas de apareamiento propuestas por Watson y Crick. Las dos cadenas antiparalelas con apareamiento de bases tienen diferente composición: la cadena de la izquierda tiene una composición A_3 T_2 G_1 C_3; la de la derecha, A_2 T_3 G_3 C_1. La secuencia es también es diferente cuando ambas cadenas se leen en dirección 5′ → 3′. Observe las equivalencias de bases: A = T y G = C en el dúplex.

lugar naturalmente a través de (1) la separación de las dos hebras y (2) la síntesis de hebras complementarias de cada una de ellas. Puesto que los nucleótidos de cada hebra nueva están unidos según una secuencia determinada por las reglas de apareamiento de bases indicadas anteriormente, cada hebra preexistente hace de molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria **(Fig. 8-15)**. Estas hipótesis se confirmaron experimentalmente, comenzando así una revolución en la comprensión de la herencia biológica.

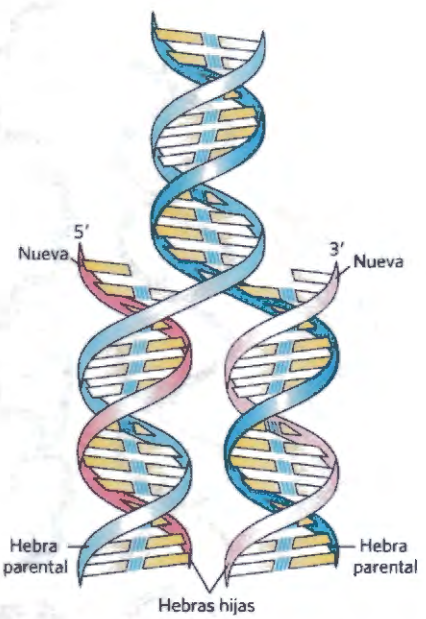


FIGURA 8-15 La replicación del DNA tal como fue sugerida por Watson y Crick. Las hebras preexistentes o "parentales" se separan, y cada una de ellas sirve de molde para la biosíntesis de una hebra complementaria "hija" (en rosa).

El DNA puede adoptar diferentes formas tridimensionales

El DNA es una molécula sumamente flexible. Es posible una rotación considerable alrededor de varios tipos de enlaces de las cadenas de azúcar-fosfato (fosfodesoxirribosa), y las fluctuaciones térmicas pueden provocar la curvatura, el estiramiento y el desapareamiento (fusión) de las hebras. En el DNA celular se observan muchas desviaciones significativas de la estructura de Watson y Crick, y algunas de ellas, si no todas, pueden jugar un papel importante en el metabolismo del DNA. Estas variaciones estructurales no tienen en general ningún efecto sobre las propiedades fundamentales del DNA definidas por Watson y Crick: complementariedad de las hebras, hebras antiparalelas y requerimiento de pares de bases A=T y G≡C.

La variación estructural del DNA refleja tres aspectos: las diferentes conformaciones posibles de la desoxirribosa, la rotación alrededor de enlaces adyacentes que forman el esqueleto de fosfodesoxirribosa **(Fig. 8-16a)**, y la libre rotación en torno del enlace C-1'-*N*-glucosídico (Fig. 8-16b). Debido a impedimentos estéricos las purinas en los nucleótidos purínicos están limitadas a dos conformaciones estables respecto de la desoxirribosa, que se denominan syn y anti (Fig. 8-16b). Las primidinas están restringidas generalmente a la conformación anti a causa de la interferencia estérica entre el azúcar y el oxígeno carbonílico en C-2 de la pirimidina.

La estructura del Watson y Crick se conoce también como **forma B del DNA** o B-DNA. La forma B es la estructura más estable que puede adoptar un DNA de secuencia al azar en condiciones fisiológicas, y es, por tanto, el punto de referencia estándar en los estudios sobre las propiedades del DNA. Las **formas A** y **Z** del DNA son dos variantes estructurales que han sido

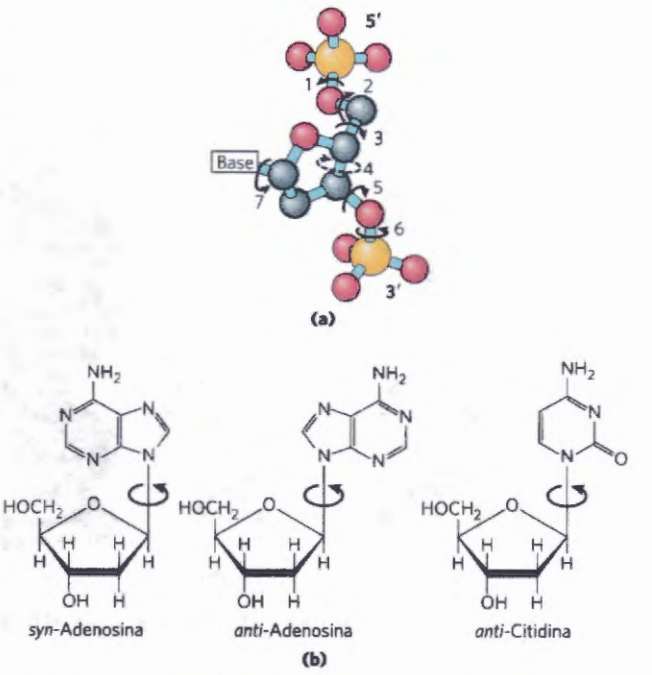
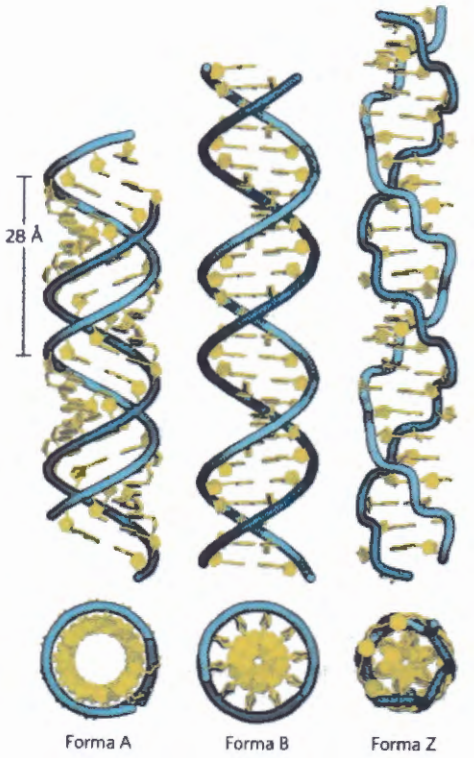


FIGURA 8-16 Variación estructural del DNA. (a) La conformación de un nucleótido en el DNA se ve afectada por la rotación en torno a siete enlaces diferentes. La rotación en torno a seis de estos enlaces es libre. La rotación limitada en torno del enlace 4 da lugar al ahuecamiento del anillo. Estas conformaciones son definidas como endo o exo según que el átomo se haya desplazado al mismo lado del plano que C-5' o al lado opuesto (véase también la Fig. 8-3b). **(b)** Sólo dos conformaciones están permitidas estéricamente a las purinas con respecto a la unión a la ribosa, la anti y la syn. Las pirimidinas se encuentran en la conformación anti.



	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Diámetro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Pares de bases por vuelta de hélice	11	10.5	12
Translación por par de bases	2,6 Å*	3,4 Å*	3,7 Å*
Inclinación de las bases respecto a la perpendicular al eje de la hélice	20°	6°	7°
Conformación "ahuecada" del azúcar	C-3' endo	C-2' endo	C-2'endo para las pirimidinas; C-3'endo para las purinas
Conformación del enlace glucosídico	Anti	Anti	Anti para las pirimidinas; syn para las purinas

FIGURA 8-17 Comparación de las formas A, B y Z del DNA. Las estructuras mostradas en la figura tienen todas ellas 36 pares de bases. Las ribosas y las bases se muestran en amarillo. El esqueleto fosfodiéster se muestra como un cordón azul. El color azul se usa en los restantes capítulos para representar las hebras del DNA. La tabla resume algunas de las propiedades de las tres formas del DNA.

caracterizadas a fondo en estructuras cristalinas. Estas tres conformaciones del DNA se muestran en la **Figura 8-17**, junto con un resumen de sus propiedades. La forma A predomina en disoluciones relativamente pobres en agua. El DNA permanece estructurado en una doble hélice dextrógira, pero la hélice es más gruesa y el número de pares de bases por vuelta es 11, en lugar de los 10,5 del B-DNA. El plano de los pares de bases de la forma A tiene una inclinación de unos 20° con respecto a los pares de bases del B-DNA, por lo que los pares de bases en el A-DNA no son totalmente perpendiculares al eje de la hélice. Estos cambios estructurales hacen que el surco ancho sea más profundo y el surco estrecho más superficial. Los reactivos utilizados para promover la cristalización del DNA tienden a deshidratarlo y por eso muchos DNA cortos cristalizan en forma A.

El Z-DNA supone una desviación mucho más radical con respecto a la forma B; la diferencia más clara es la rotación a izquierdas (levógira) de la hélice. Contiene 12 pares de bases por vuelta, y la estructura es más delgada y alargada. El esqueleto del DNA adopta un plegamiento en zig-zag. Ciertas secuencias de nucleótidos se pliegan más fácilmente que otras en hélices Z levógiras. Los ejemplos más característicos son las secuencias en las que se alternan pirimidinas y purinas, especialmente aquellas en las que se alternan C y G o 5-metil-C y G. Con el fin de formar parte de la doble hélice levógira del DNA las purinas adoptan la conformación syn alternando con pirimidinas en la conformación anti. En el DNA Z el surco mayor es apenas observable, mientras que el surco menor es estrecho y profundo.

No está claro todavía que el A-DNA se encuentre en las células, pero hay datos a favor de la presencia de fragmentos cortos (regiones) de Z-DNA tanto en bacterias como en eucariotas. Estas regiones de DNA pueden tener un papel (todavía por definir) en la regulación de la expresión de algunos genes o en la recombinación genética.

Algunas secuencias de DNA adoptan estructuras no habituales

En cromosomas de gran tamaño se han encontrado otras variaciones estructurales dependientes de la secuencia que pueden afectar a las funciones y al metabolismo de segmentos de DNA situados en su inmediata vecindad. Por ejemplo, siempre que se encuentren cuatro o más adenosinas consecutivas en una de las hebras se produce la curvatura de la hélice. Seis adenosinas seguidas provocan una curvatura de aproximadamente 18°. La curvatura observada en ésta y otras secuencias puede tener importancia en la unión de algunas proteínas al DNA.

Un tipo de secuencia bastante común en el DNA es el **palíndromo**. Un palíndromo es una palabra, frase o verso que se deletrea de manera idéntica leyéndola del derecho o del revés; por ejemplo, "Dábale arroz a la zorra el abad". Este término se aplica a regiones del DNA con **repeticiones invertidas** de secuencia de bases con simetría binaria en las dos hebras del DNA **(Fig. 8-18)**.

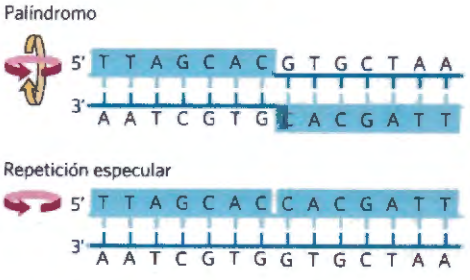


FIGURA 8-18 Palíndromos y repeticiones especulares. Los palíndromos son secuencias de los ácidos nucleicos de doble cadena con simetría binaria. Para superponer una repetición (secuencia sombreada) sobre la otra debe realizarse una rotación de 180° alrededor del eje horizontal, y a continuación otra de 180° alrededor del eje vertical, tal como muestran las flechas coloreadas. Por su parte, una repetición especular presenta una secuencia simétrica en cada hebra. La superposición de una repetición sobre la otra requiere una única rotación de 180° alrededor del eje vertical.

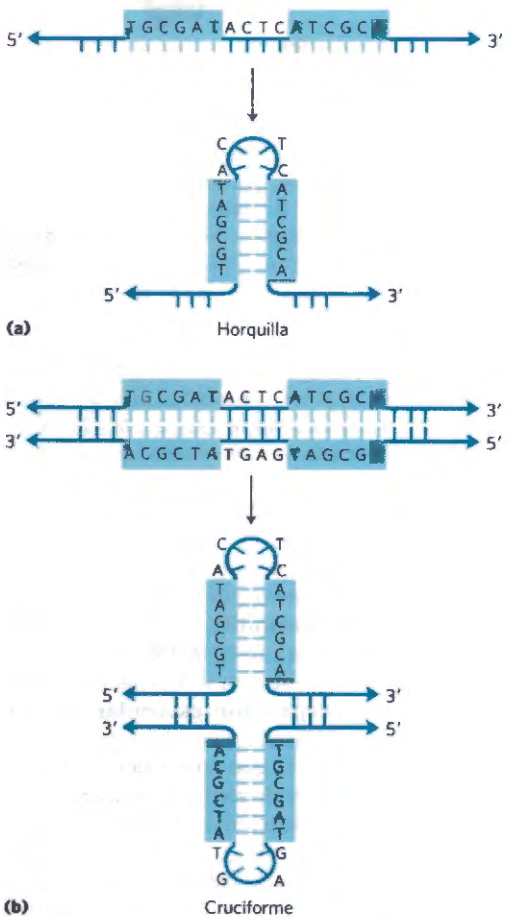
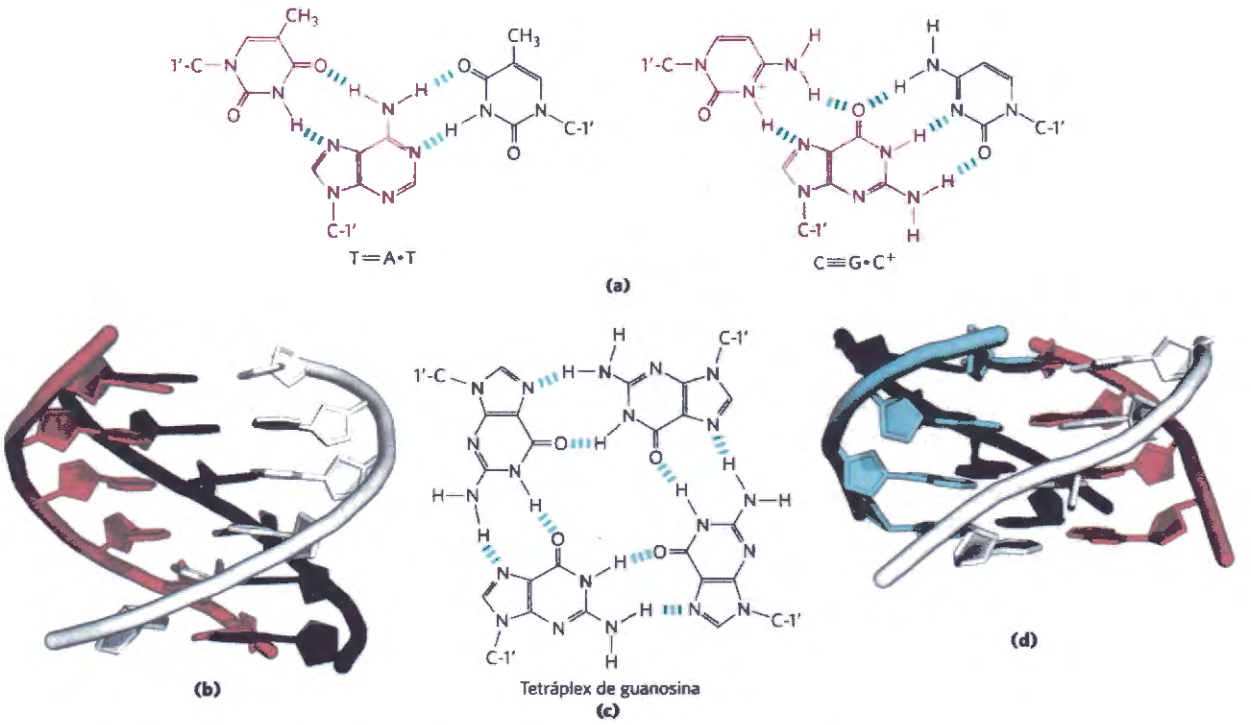


FIGURA 8-19 Horquillas y cruciformes. Las secuencias palindrómicas del DNA (o del RNA) pueden formar estructuras alternativas mediante apareamiento de bases intracatenario. **(a)** Cuando está implicada únicamente una de las hebras del DNA (o del RNA) se denomina estructura en horquilla. **(b)** Cuando están implicadas las dos hebras de un dúplex de DNA, la estructura se denomina cruciforme. El sombreado en azul resalta las secuencias asimétricas que pueden aparearse alternativamente con una secuencia complementaria en la misma hebra o en la hebra opuesta.



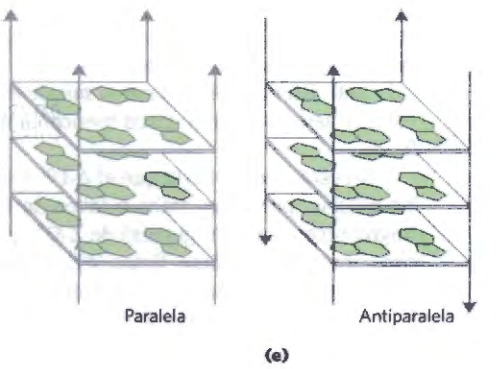


FIGURA 8-20 Estructuras de DNA con tres o cuatro hebras. (a) Patrones de apareamiento de una forma de DNA tríplex bien caracterizada. El apareamiento de Hoogsteen se muestra en rojo en ambos casos. **(b)** DNA de hélice triple con dos hebras de pirimidina (rojo y blanco, secuencia TTCCT) y una hebra de purina (azul, secuencia AAGGAA) (tomado de PDB ID 1BCE). Las hebras azul y blanca son antiparalelas y están asociadas por patrones de apareamiento normales de Watson y Crick. La tercera hebra (toda de pirimidinas en rojo) es paralela a la hebra de purinas y está apareada con puentes de hidrógeno distintos de los de Watson y Crick. La vista es lateral y se representan seis tripletes. **(c)** Patrón de apareamiento de bases en la estructura del tetráplex de guanosina. **(d)** Cuatro tetráplex sucesivos de una estructura tetráplex G (PBD ID 244D). **(e)** Posibles variantes en la orientación de las hebras en un tetráplex G. [Fuentes: (b) Modified from PDB ID 1BCE, J. L. Asensio et al., *Nucleic Acids Res.* 26:3677, 1998. (d) PDB ID 244D, G. Laughlan et al., *Science* 265:520, 1994.]

Estas secuencias son autocomplementarias en cada una de las hebras y tienen, por tanto, el potencial de formar estructuras en **horquilla** o estructuras **cruciformes** (en forma de cruz) **(Fig. 8-19)**. Cuando la secuencia invertida se encuentra en ambas hebras del DNA, recibe el nombre de **repetición especular**. Las repeticiones especulares no tienen secuencias complementarias en la misma hebra por lo que no pueden formar estructuras en horquilla o cruciformes. Secuencias de este tipo se encuentran prácticamente en todas las moléculas de DNA de gran tamaño y pueden abarcar desde unos pocos a varios miles de pares de bases. Se desconoce en qué medida los palíndromos adoptan la estructura cruciforme en las células, aunque se ha demostrado la existencia in vivo de algunas estructuras cruciformes en *Escherichia coli*. Las secuencias autocomplementarias hacen que las hebras sencillas de DNA (o RNA) aisladas se plieguen en disolución en forma de estructuras complejas que contienen múltiples horquillas.

Varias estructuras poco comunes del DNA constan de tres o incluso cuatro hebras. Los nucleótidos que participan en los pares de bases de Watson y Crick (Figura 8-11) pueden formar puentes de hidrógeno adicionales, sobre todo con los grupos funcionales que se encuentran en el surco mayor. Por ejemplo, un residuo de citidina (si está protonado) puede aparearse con el residuo guanosina de un par nucleotídico G≡C, y la timidina puede aparearse con la adenosina de un par A=T **(Figura 8-20a)**. Los átomos N-7, O^6 y N^6 de las purinas, que participan en los puentes de hidrógeno del DNA tríplex son conocidos como **posiciones de Hoogsteen**, y el apareamiento que no sigue el patrón de Watson y Crick se denomina **apareamiento de Hoogsteen**, en referencia a Karst Hoogsteen, quien en 1963 sugirió por primera vez la posibilidad de este tipo de apareamiento. Los apareamientos de Hoogsteen permiten la formación de **DNA tríplex**. Los tríplex mostrados en la Figura 8-20 (a, b) son más estables a pH bajo porque el triplete C≡G·C^+ requiere una citosina protonada. En el tríplex, el pK_a de esta citosina es >7,5, mientras que su valor normal es de 4,2. Los tríplex también se forman más fácilmente con largas secuencias que contengan sólo pirimidinas o sólo purinas en una de las hebras. Algunos tríplex contienen dos hebras de pirimi-

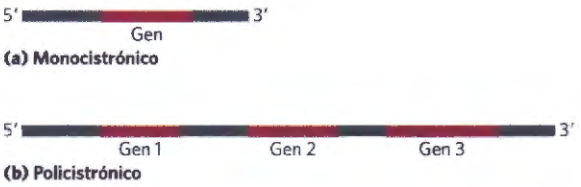


FIGURA 8-21 mRNA bacteriano. Diagramas esquemáticos de un mRNA monocistrónico **(a)** y de otro policistrónico **(b)** bacterianos. Los segmentos rojos representan el RNA que codifica un producto génico; los segmentos grises representan RNA no codificante. En el trascrito policistrónico, los tres genes están separados por RNA no codificante.

dina y una hebra de purina, otros contienen dos hebras de purina y una de pirimidina.

cuatro hebras de DNA también pueden aparearse para formar un tetráplex (cuadrúplex), pero sólo se forma con facilidad en secuencias de DNA con una alta proporción de residuos de guanosina (Figura 8-20c,d). El tetráplex de guanosina, o **tetráplex G**, es muy estable en un amplio abanico de condiciones. La orientación de las hebras en el tetráplex puede variar tal como se muestra en la Figura 8-20e.

En el DNA de células vivas, los sitios de reconocimiento de muchas proteínas que se unen a secuencias específicas (Capítulo 28) tienen secuencias palindrómicas, y en las regiones implicadas en la regulación de la expresión de algunos genes eucarióticos se encuentran secuencias de polipurina y polipirimidina que pueden formar hélices triples. En principio, hebras de DNA sintético, diseñadas para aparearse con estas secuencias y formar hélices triples podrían alterar la expresión génica. El control del metabolismo celular mediante estos métodos tiene cada vez mayor importancia comercial por sus potenciales aplicaciones en medicina y agricultura.

Los RNA mensajeros codifican las cadenas polipeptídicas

Ahora dirigiremos nuestra atención a la expresión de la información genética contenida en el DNA. El RNA, el segundo tipo principal de ácido nucleico de la célula, desempeña muchas funciones. En la expresión génica, actúa de intermediario en la conversión de la información codificada en el DNA en la secuencia de aminoácidos de las proteínas funcionales.

En los eucariotas, el DNA se encuentra en su mayor parte confinado en el núcleo, mientras que la síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas del citoplasma. Por lo tanto, una molécula distinta del DNA debe transportar el mensaje genético desde el núcleo hasta el citoplasma. Ya en la década de 1950, el RNA era considerado como el candidato natural: se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y el aumento de la síntesis proteica está acompañado de un aumento de la cantidad de RNA en el citoplasma y de un aumento de su velocidad de recambio. Estas y otras observaciones indujeron a algunos investigadores a proponer que el RNA transportaba la información genética desde el DNA hasta los ribosomas, donde se sintetizan las proteínas. En 1961, François Jacob y Jacques Monod presentaron una teoría unificada (esencialmente correcta) de los diversos aspectos de este proceso. Propusieron el nombre de "RNA mensajero" (mRNA) para la fracción de RNA celular total que traslada la información genética desde el DNA a los ribosomas. Los mRNA se forman sobre un molde de DNA en el proceso de la **transcripción**. Una vez han alcanzado los ribosomas, los mensajeros actúan de molde para especificar las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas. A pesar de que la longitud de los mRNA de genes diferentes puede variar mucho, los mRNA de un gen determinado tienen normalmente un tamaño definido.

En las bacterias y arqueas, una única molécula de mRNA puede codificar una o varias cadenas polipeptídicas. Si únicamente contiene información para la síntesis de un solo polipéptido, el mRNA es **monocistrónico**; si codifica dos o más polipéptidos diferentes, el mRNA es **policistrónico**. Los mRNA eucarióticos son, en su mayoría, monocistrónicos. (El término cistrón, por cuanto afecta a esta discusión, es sinónimo de gen. El término tiene sus raíces históricas en la genética, pero su definición genética rigurosa va más allá del ámbito de este texto). La longitud mínima de un mRNA viene determinada por la longitud de la cadena polipeptídica que codifica. Por ejemplo, una cadena polipeptídica de 100 residuos aminoácidos requiere una secuencia codificante de RNA de al menos 300 nucleótidos, puesto que cada aminoácido está codificado por un triplete de nucleótidos (éste y otros detalles de la síntesis proteica son tratados en el Capítulo 27). Sin embargo, los mRNA transcritos a partir del DNA son siempre algo más largos de lo estrictamente necesario para codificar una secuencia (o secuencias) polipeptídica(s). El RNA no codificante adicional incluye secuencias que regulan la síntesis proteica. En la **Figura 8-21** se resume la estructura general de los mRNA bacterianos.

Muchos RNA tienen estructuras tridimensionales complejas

El RNA mensajero es sólo una de las varias clases de RNA celulares. Los RNA de transferencia actúan como moléculas adaptadoras en la síntesis proteica; unidos covalentemente a un aminoácido por un extremo, se aparean con el mRNA, de tal forma que los aminoácidos se unen a la cadena polipeptídica en proceso de crecimiento con la secuencia correcta. Los RNA ribosómicos son componentes de los ribosomas. También se conoce una amplia variedad de RNA con funciones especiales, incluyendo algunos con actividad enzimática (denominados ribozimas). Todos ellos se describen en detalle en el Capítulo 26. Las diversas y a menudo, complejas funciones de estos RNA son reflejo de una diversidad de estructuras mucho más rica que la observada en el DNA.

El producto de la transcripción del DNA es siempre un RNA de cadena sencilla. Las monohebras tienden a adoptar una conformación helicoidal dextrógira, determinada por las interacciones de apilamiento de las bases **(Fig. 8-22)**, que son más fuertes entre dos purinas que entre una purina y una pirimidina o entre dos pirimidinas. La interacción purina-purina es tan fuerte que una pirimidina que se encuentre entre dos purinas suele ser desplazada de la estructura de bases apiladas para que puedan interaccionar las dos purinas. Cualquier secuencia autocomplementaria de la molécula dará lugar a estructuras más complejas. El RNA puede formar pares de bases con regiones complementarias de RNA o de DNA. Las reglas de apareamiento son las mis-

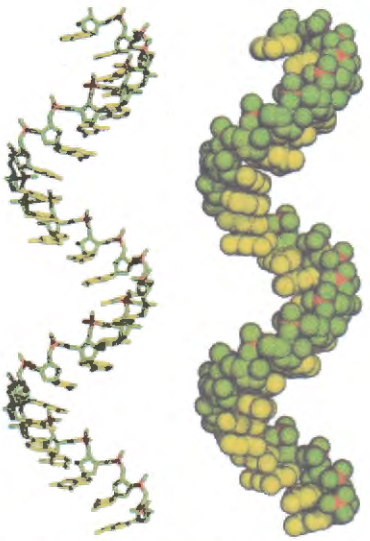


FIGURA 8-22 Típico apilamiento dextrógiro de un RNA de cadena sencilla. Las bases se muestran en amarillo, los átomos de fósforo en naranja y las ribosas y los oxígenos de los fosfatos en verde. El verde se usa en los siguientes capítulos para representar las hebras RNA, mientras que el azul se usa para representar el DNA.

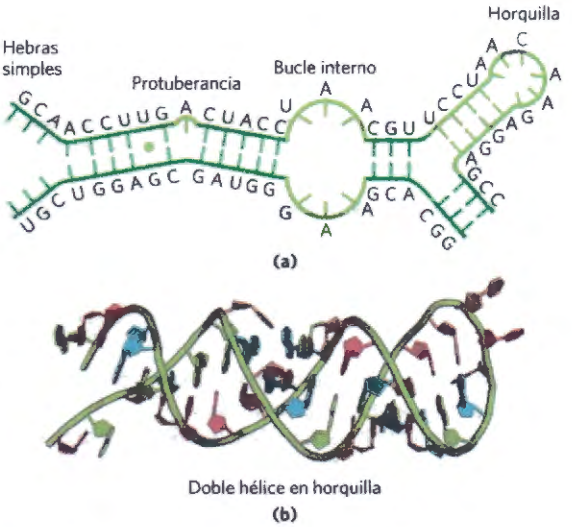
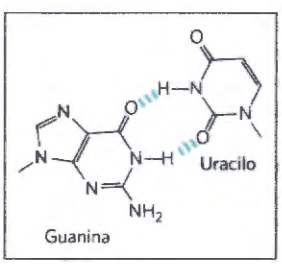
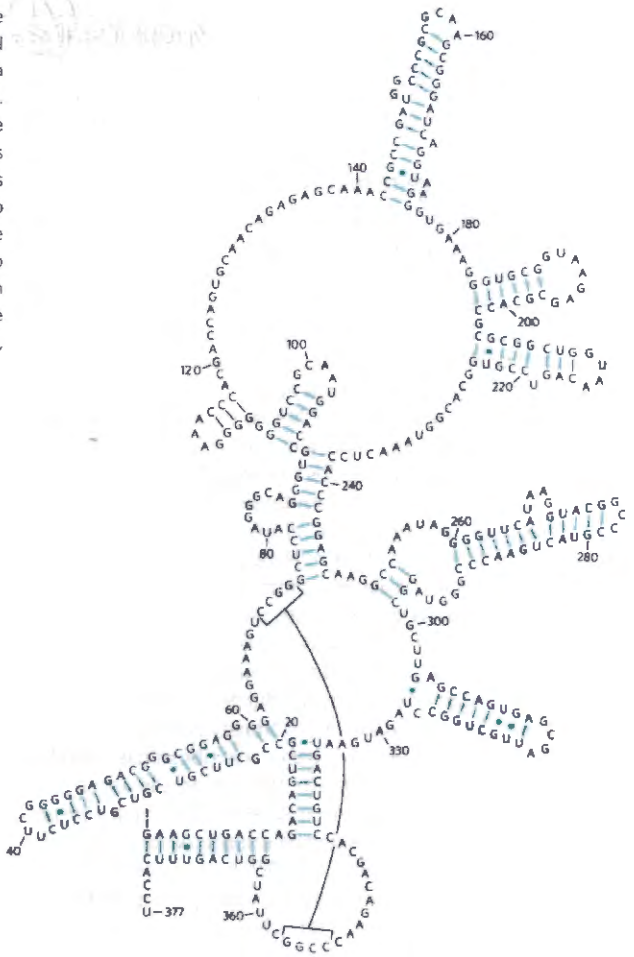


FIGURA 8-23 Estructura secundaria del RNA. (a) Protuberancia, bucle interno, y bucle en horquilla. **(b)** Las regiones apareadas adoptan generalmente una estructura en hélice dextrógira de la forma A, tal como se muestra para una horquilla (tomado de PDB ID 1GID). [Fuente: (b) Modified from PDB ID 1GID, J. H. Cate et al., *Science* 273:1678, 1996.]

FIGURA 8-24 Estructuras helicoidales apareadas de un RNA. Se muestra la posible estructura secundaria del RNA M1 componente del enzima RNasa P de *E. coli*, en la que se observan muchas horquillas. La RNasa P contiene también un componente proteico (no representado). Este enzima actúa en la maduración de los RNA de transferencia (véase la Fig. 26-26). Los dos corchetes señalan secuencias complementarias adicionales que pueden aparearse en la estructura tridimensional. Los puntos azules indican los pares de bases G=U (en el recuadro) que no son de Watson y Crick. Hay que señalar que los pares de bases G=U se forman solamente cuando cadenas de RNA presintetizadas se pliegan o hibridan entre sí. No hay RNA polimerasas (los enzimas que sintetizan RNA sobre un molde de DNA) que inserten U enfrente de un molde de G, o viceversa, durante la síntesis del RNA.[Fuente: B. D. James et al., *Cell* 52:19, 1988.]





mas que en el DNA: la G se aparea con la C y la A con el U (o con los raros residuos de T de algunos RNA). Una diferencia destacable es que el apareamiento entre residuos de G y U, muy raro en el DNA, está permitido en el RNA (véase la Fig. 8-24) cuando secuencias complementarias en dos hebras sencillas de RNA se aparean entre sí. Las hebras apareadas de RNA o de dúplex RNA- DNA son antiparalelas, como en el DNA.

Cuando se aparean dos hebras de RNA de secuencias perfectamente complementarias, la estructura en doble hebra predominante es una doble hélice dextrógira en forma A. Sin embargo, no son comunes hebras de RNA perfectamente apareadas en un largo trecho. Las estructuras tridimensionales de muchos RNA, al igual que las de las proteínas, son complejas y únicas. Las interacciones débiles, y en especial las interacciones de apilamiento de las bases, tienen un papel importante en la estabilización de la estructura del RNA, al igual que en el DNA. En el laboratorio se han conseguido hélices en forma Z (en condiciones de muy alta fuerza iónica o elevada temperatura). No se ha observado la forma B en el RNA. Son frecuentes las interrupciones en la hélice A regular a causa de bases no apareadas o incorrectamente apareadas en una o en las dos hebras, y ello da lugar a la formación de protuberancias o bucles internos **(Fig. 8-23)**. Los bucles en horquilla se forman entre secuencias autocomplementarias (palindrómicas) cercanas en la hebra de RNA. El potencial de formación de estructuras helicoidales con apareamiento de bases es muy grande en muchos RNA **(Fig. 8-24)**, y las horquillas resultantes son el tipo de estructura secundaria más común en el RNA. Secuencias cortas específicas (tales como UUCG) se encuentran a menudo en los extremos de las horquillas de RNA, y se ha observado que forman bucles muy rígidos y estables. Es posible que estas secuencias tengan un papel importante en la nucleación del plegamiemto de las moléculas de RNA en su estructura tridimensional precisa. Otros enlaces de hidrógeno diferentes de los enlaces estándar definidos por los apareamientos de Watson y Crick también contribuyen a la estructura. Por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo de la ribosa puede formar un enlace de hidrógeno con otros grupos. Algunas de estas propiedades pueden observarse en la estructura del fenilalanil-tRNA de levadura -el tRNA responsable de insertar residuos de Phe en los polipéptidos- y en dos enzimas de RNA o ribozimas, cuyas propiedades, como las de las proteínas enzimáticas, dependen de su estructura tridimensional **(Fig. 8-25)**.

El análisis de la estructura del RNA y de la relación entre su estructura y función es un tema emergente de investigación, que presenta un grado de complejidad equivalente al del análisis de la estructura de las proteínas. La importancia del conocimiento de la estructura del RNA crece a medida que aumenta la información sobre el gran número de funciones que llevan a cabo estas moléculas.

RESUMEN 8.2 Estructura de los ácidos nucleicos

■ Hay muchos datos a favor de que el DNA contiene la información genética. Los primeros indicios resultaron del experimento de Avery-MacLeod-McCarty, que reveló que el DNA aislado de una cepa bacteriana puede incorporarse y transformar a las células de otra cepa, confiriéndoles algunas de las características heredables de la cepa donante. El experimento de Hershey-Chase mostró que el DNA de un virus bacteriano, pero no así su cápsida proteica, contiene el mensaje genético para la replicación del virus en la célula huésped.

■ Combinando todos los datos disponibles, Watson y Crick propusieron que el DNA nativo consiste en dos cadenas antiparalelas dispuestas en forma de doble hélice dextrógira. Los pares de bases complementarios A=T y G≡C se forman mediante puentes de hidrógeno dentro de la hélice. Los pares de bases están apilados perpendicularmente al eje mayor de la doble hélice, separados por 3,4 Å y con 10,5 pares de bases por vuelta.

■ El DNA puede adoptar diferentes formas estructurales. Dos variantes de la forma de Watson y Crick, o B-DNA, son el A- y el Z-DNA. Algunos cambios estructurales dependientes de secuencia provocan la curvatura de la molécula de DNA. Hebras de DNA con secuencias apropiadas pueden formar bucles en horquilla o estructuras cruciformes o DNA tríplex o tetráplex.

■ El RNA mensajero transfiere la información genética del DNA a los ribosomas para la síntesis proteica. El RNA de transferencia y el RNA ribosómico también intervienen en la síntesis proteica. El RNA puede ser estructuralmente complejo; las cadenas sencillas de RNA pueden formar horquillas, regiones de doble cadena o bucles complejos.

8.3 Química de los ácidos nucleicos

El papel del DNA como depositario de la información genética depende, en parte, de su estabilidad intrínseca. Las transformaciones químicas del DNA en ausencia de un catalizador enzimático son generalmente muy lentas. Sin embargo, el almacenamiento de la información a largo plazo sin que sufra alteraciones es tan importante para la célula que incluso reacciones muy lentas que alteren la estructura del DNA pueden tener repercusiones fisiológicas significativas. Procesos tales como la carcinogénesis y el envejecimiento pueden estar íntimamente asociados a la lenta acumulación de alteraciones irreversibles en el DNA. Otras alteraciones no destructivas, tales como la separación de las hebras previa a la replicación o la transcripción del DNA también son importantes. Además de proporcionarnos información sobre procesos biológicos, el conocimiento de la química de los ácidos nucleicos nos ha dotado de una poderosa gama de metodologías que tienen aplicación en biología molecular, medicina y medicina forense. A continuación examinaremos las propiedades químicas del DNA y algunas de estas tecnologías.

El DNA y el RNA de doble hélice se pueden desnaturalizar

Las disoluciones de DNA nativo que haya sido cuidadosamente aislado son muy viscosas a pH 7,0 y temperatura ambiente (25 °C). Cuando una disolución con estas características se somete a valores extremos de pH o a temperaturas superiores a 80 °C, su viscosidad desciende abruptamente, lo cual indica que el DNA ha sufrido un cambio en su estado físico. Del mismo modo que el calor y los valores extremos de pH desnaturalizan las proteínas globulares, también provocan la desnaturali-

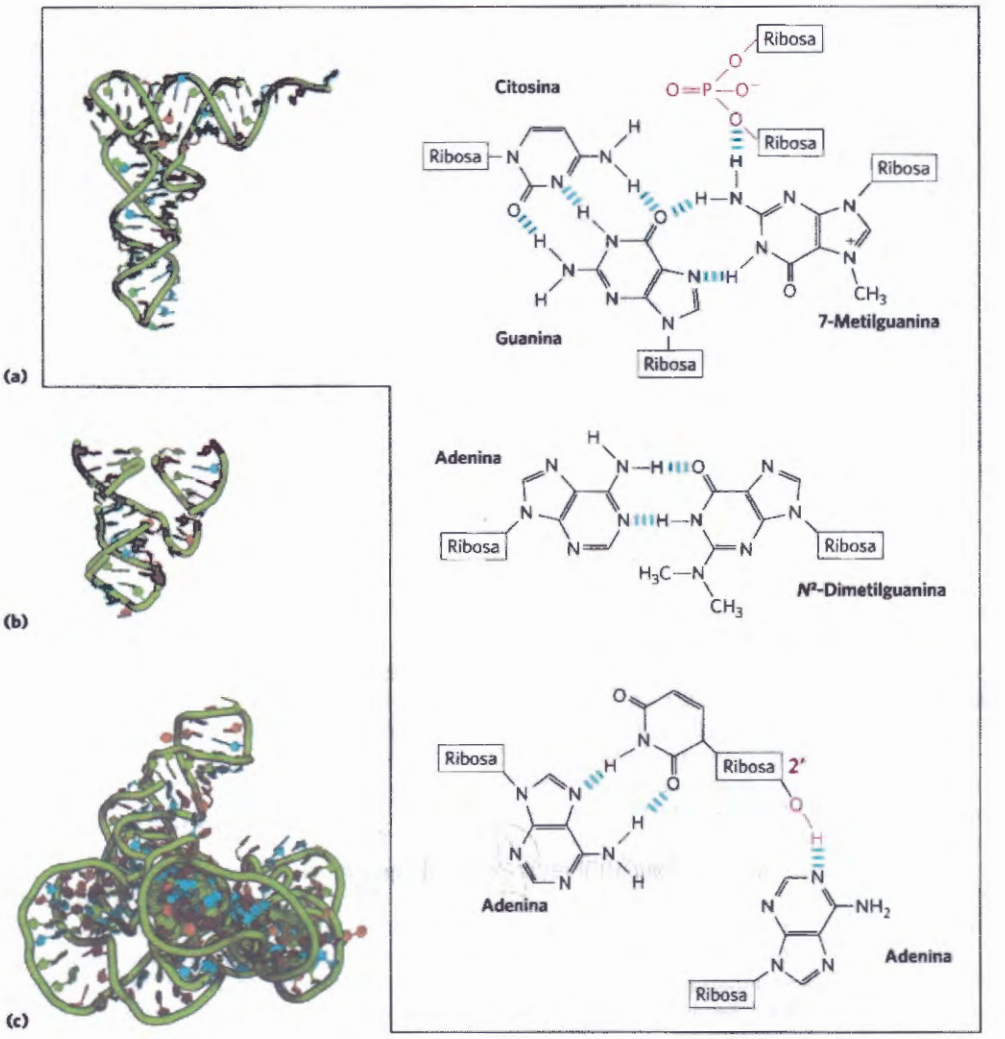


FIGURA 8-25 Estructura tridimensional del RNA. (a) Estructura tridimensional del tRNA de la fenilalanina de levadura (PDB ID 1TRA). En este tRNA se muestran algunos apareamientos de bases no habituales. Observe también la participación del oxígeno de un enlace fosfodiéster en un enlace de hidrógeno, y de un grupo 2'-hidroxilo en otro (ambos en rojo). **(b)** Ribozima en cabeza de martillo (llamado así porque la estructura secundaria en el centro activo recuerda la cabeza de un martillo) de algunos virus vegetales (proveniente de PDB ID 1MME). Las ribozimas, o enzimas de RNA, catalizan diversas reacciones, principalmente del metabolismo del RNA y de la síntesis proteica. Las complejas estructuras tridimensionales de estos RNA reflejan la complejidad inherente a la catálisis, tal como se ha descrito para los enzimas proteicos en el Capítulo 6. **(c)** Segmento de mRNA, conocido como intrón, del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (obtenido de PDB ID 1GRZ). Este intrón (un ribozima) cataliza su propia escisión entre dos exones en una hebra de mRNA (examinado en el Capítulo 26). [Fuentes: (a) PDB ID 1TRA, E. Westhof and M. Sundaralingam, *Biochemistry* 25:4868, 1986. (b) Modified from PDB ID 1MME, W. G. Scott et al., *Cell* 81:991, 1995. (c) Modified from PDB ID 1GRZ, B. L. Golden et al., *Science* 282:259, 1998.]

zación o fusión del DNA de doble hélice. La rotura de los enlaces de hidrógeno de los pares de bases y del apilamiento de las bases provoca el desenrollamiento de la doble hélice, para formar dos hebras sencillas separadas la una de la otra en toda o parte de su extensión (desnaturalización parcial). Los enlaces no covalentes del DNA se rompen **(Fig. 8-26)**.

La renaturalización de una molécula de DNA es un proceso rápido de un solo paso, siempre que todavía haya un segmento en doble hélice de una docena o más de residuos que mantenga unidas las dos hebras. Cuando la temperatura o el pH retornan a valores situados dentro de los márgenes en los que viven la mayoría de organismos, los segmentos desenrollados de las dos hebras vuelven a enrollarse espontáneamente, o a **hibridar,** para restablecer el dúplex intacto (Fig. 8-26). Sin embargo, si las dos hebras están completamente separadas, la renaturalización se produce en dos pasos. En el primero, relativamente lento, las dos hebras se "reconocen" mediante colisiones al azar hasta formar un fragmento corto de doble hélice complementaria. El segundo paso es mucho más rápido: las bases no apareadas restantes entran en registro y se aparean sucesivamente como en una "cremallera" para formar la doble hélice.

Las interacciones de apilamiento de las bases de los ácidos nucleicos causan una disminución de la absorción de la luz UV, en relación con la absorción de una disolución de nucleótidos de la misma concentración; la absorción disminuye todavía más cuando se forma la doble cadena complementaria. Este fenómeno se denomina efecto hipocrómico. La desnaturalización de un

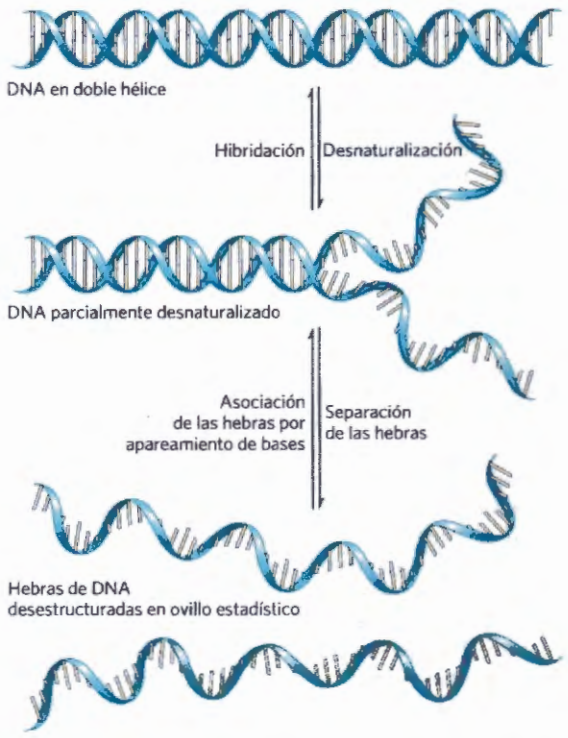


FIGURA 8-26 Desnaturalización e hibridación (renaturalización) reversibles del DNA.

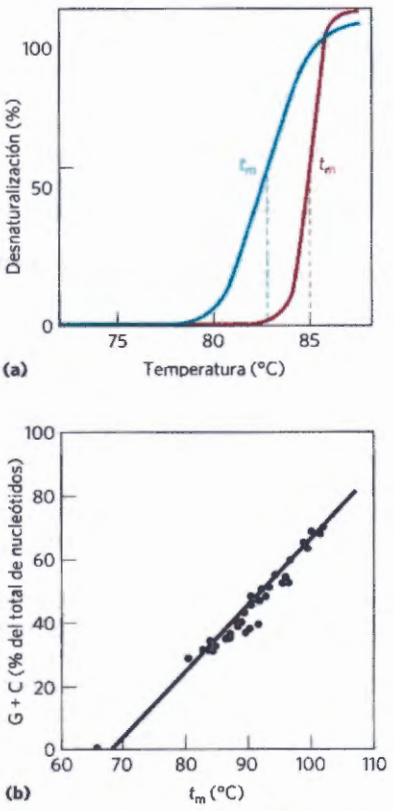


FIGURA 8-27 Desnaturalización térmica del DNA. (a) Curvas de desnaturalización, o de fusión, de dos muestras de DNA. La temperatura en el punto medio de la transición (t_m) es el punto de fusión; depende del pH, de la fuerza iónica y del tamaño y composición de bases del DNA. **(b)** Relación entre la t_m y el contenido en G+C de un DNA. [Fuente: (b) Adapted from J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962.]

ácido nucleico de doble cadena produce el efecto contrario, es decir, un incremento de la absorción, denominado efecto hipercrómico. La transición del DNA de cadena doble a la forma de cadena sencilla desnaturalizada puede seguirse, por tanto, midiendo la absorción de luz UV de 260 nm.

Las moléculas de DNA bacteriano o vírico en disolución se desnaturalizan cuando se calientan lentamente **(Fig. 8-27)**. Cada especie de DNA tiene una temperatura de desnaturalización característica, denominada punto de fusión (t_m; específicamente, la temperatura a la cual la mitad del DNA se encuentra como hebras sencillas separadas): cuanto mayor es el contenido de G≡C, más alto es el punto de fusión del DNA. Ello es debido a que los pares de bases G≡C, con tres puentes de hidrógeno, requieren más energía calorífica para disociarse que los pares A=T. La medición del punto de fusión de una muestra de DNA, en condiciones de pH y fuerza iónica definidas, puede proporcionar una estimación de su composición en bases. Si se controlan con cuidado las condiciones de desnaturalización, las regiones ricas en pares A=T se desnaturalizarán específicamente, mientras que la mayor parte del DNA seguirá en forma de doble hebra. Estas regiones desnaturalizadas (denominadas burbujas) pueden observarse con el microscopio electrónico **(Fig. 8-28)**. La separación de las hebras del DNA debe tener lugar necesariamente in vivo durante procesos tales como la replicación y la transcripción. Como veremos, los sitios del DNA donde se inician estos procesos suelen ser ricos en pares de bases A=T.

Los dúplex formados por dos hebras de RNA o por una de RNA y otra de DNA (híbridos RNA-DNA) también pueden desnaturalizarse. Es de destacar que los dúplex de RNA son más estables que los dúplex de DNA frente a la desnaturalización térmica. A pH neutro, un

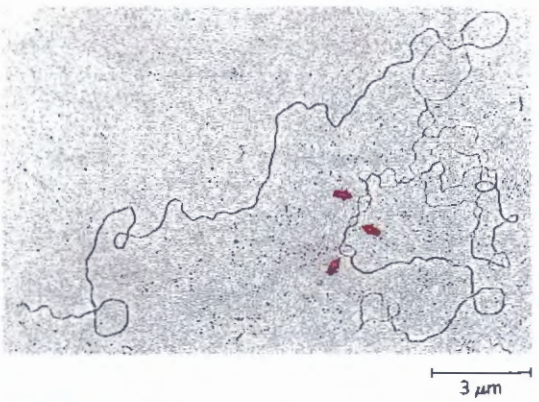


FIGURA 8-28 DNA parcialmente desnaturalizado. Este DNA fue parcialmente desnaturalizado y a continuación fijado para impedir su renaturalización durante la preparación de la muestra. El método de sombreado empleado en esta micrografía electrónica para visualizar el DNA aumenta su diámetro unas cinco veces e impide ver los detalles de la hélice. Sin embargo, pueden obtenerse medidas de longitud, y las regiones de cadena sencilla se distinguen fácilmente de las de cadena doble. Las flechas señalan algunas burbujas de cadena sencilla, donde se ha producido desnaturalización. Las regiones que se desnaturalizan son muy reproducibles y son ricas en pares de bases A=T. [Fuente: Ross B. Inman.]

RNA de doble hélice se desnaturaliza a una temperatura 20 °C, o más, superior a la temperatura de desnaturalización de una molécula de DNA de secuencia comparable, suponiendo que las hebras de ambas moléculas sean perfectamente complementarias. La estabilidad de un híbrido RNA-DNA es normalmente intermedia entre la de los dúplex de RNA y de DNA. Se desconoce la base física de estas diferencias de estabilidad térmica.

EJEMPLO RESUELTO 8-1 Pares de bases y estabilidad del DNA

En muestras de DNA aisladas de dos especies bacterianas no identificadas, X e Y, la adenina representa el 32% y el 17%, respectivamente, del total de bases. ¿Qué proporciones relativas de adenina, guanina, timina y citosina esperaría encontrar en las dos muestras de DNA? ¿Qué supuestos ha considerado? Una de estas especies fue aislada de un manantial termal (64 °C) ¿Qué especie es probablemente la bacteria termófila y por qué?

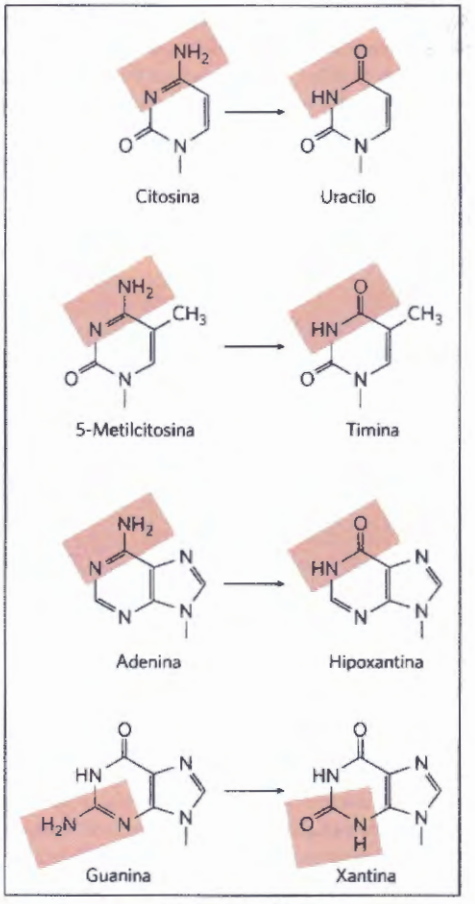
Solución: Para cualquier DNA en doble hélice, A=T y G≡C. El DNA de la especie X tiene 32% de A y por lo tanto debe contener 32% de T. Ello representa el 64% de la bases y deja el 36% restante para los pares G≡C: 18% de G y 18% de C. La muestra de la especie Y, con 17% de A, debe contener 17% de T, correspondiente al 34% de los pares de bases. El 66% restante de las bases está, pues, distribuido a partes iguales como 33% de G y 33% de C. Este cálculo se apoya en el supuesto de que ambas moléculas de DNA son de doble cadena.

Cuanto mayor sea el contenido de G+C de una molécula de DNA mayor será su temperatura de fusión. La especie Y, con el DNA con mayor contenido de G+C (66%), es muy probablemente la bacteria termófila; su DNA tiene una mayor temperatura de fusión y por tanto es más estable a la temperatura de la fuente termal.

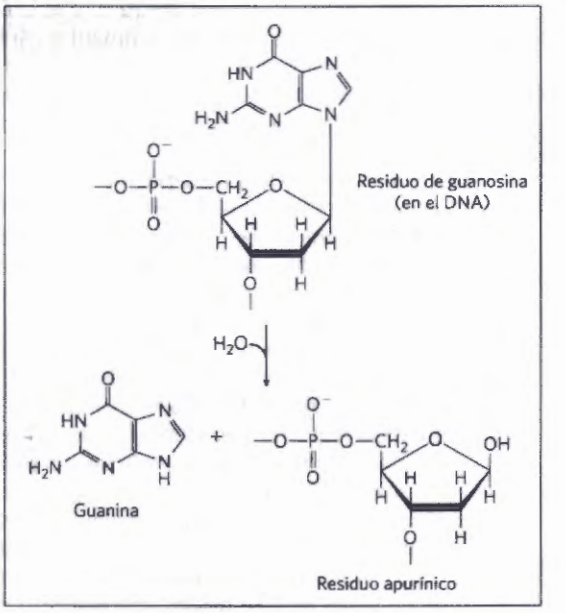
Los nucleótidos y los ácidos nucleicos experimentan transformaciones no enzimáticas

Las purinas y pirimidinas, junto con los nucleótidos de los que forman parte, experimentan una serie de alteraciones espontáneas de su estructura covalente. Estas reacciones son normalmente *muy lentas*, pero resultan fisiológicamente significativas a causa de la muy baja tolerancia de la célula a las alteraciones de su información genética. Las alteraciones en la estructura del DNA que dan lugar a cambios permanentes en la información genética codificada por la molécula se denominan **mutaciones**. Hay muchas pruebas a favor de una estrecha relación entre la acumulación de mutaciones y los procesos de envejecimiento y el cáncer.

Varias bases nucleotídicas sufren la pérdida espontánea de sus grupos amino exocíclicos (desaminación) **(Fig. 8-29a)**. Por ejemplo, en condiciones intracelulares típicas, la desaminación de citosina (del DNA) para



(a) Desaminación



(b) Despurinación

FIGURA 8-29 Algunas reacciones no enzimáticas bien caracterizadas de los nucleótidos. (a) Reacciones de desaminación. Sólo se muestra la base. **(b)** Despurinación, en la que se pierde una purina por hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico. La pérdida de pirimidinas tiene lugar mediante una reacción similar pero mucho más lenta. La lesión resultante en la que está presente la desoxirribosa pero no la base, se denomina sitio abásico o sitio AP (sitio apurínico o, raramente, apirimidínico). La desoxirribosa restante después de la despurinación se convierte rápidamente de la forma β-furanósica a la forma aldehído (véase la Fig. 8-3), que desestabiliza todavía más el DNA en esta posición. Otras reacciones no enzimáticas están ilustradas en las Figuras 8-31 y 8-32.

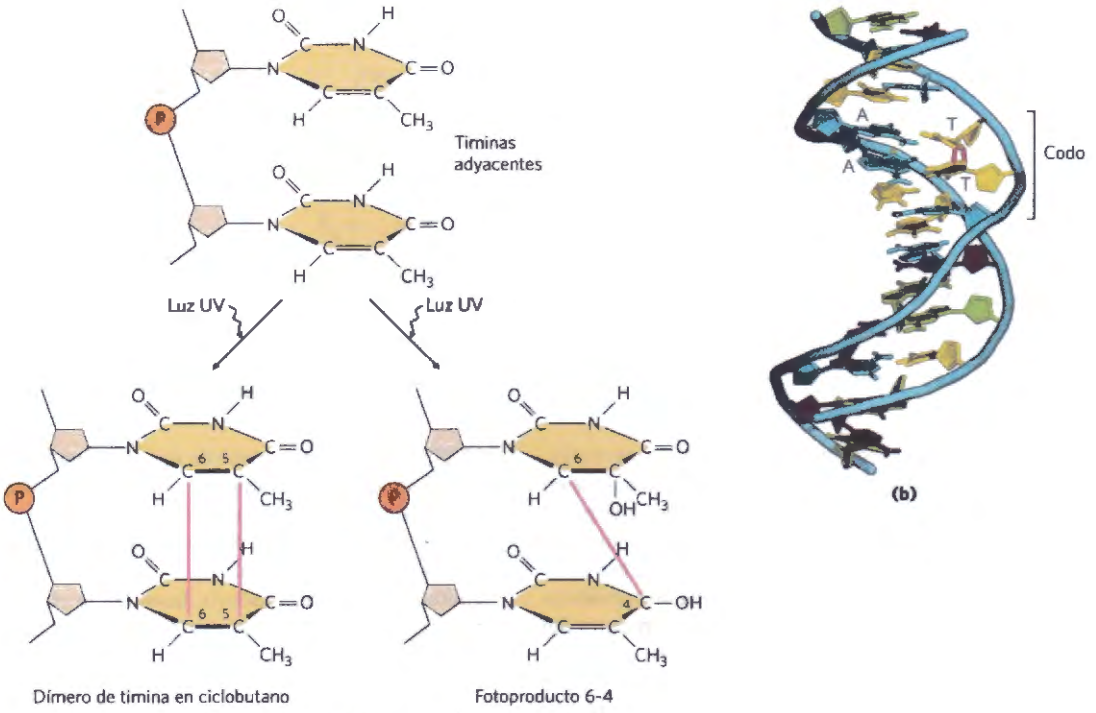


FIGURA 8-30 Formación de dímeros de pirimidina inducida por la luz UV. (a) Un tipo de reacción (a la izquierda) tiene como resultado la formación de un anillo de ciclobutilo en el que intervienen los C-5 y C-6 de los residuos adyacentes de pirimidina. Una reacción alternativa (a la derecha) tiene como resultado un fotoproducto 6-4, con un enlace entre el C-6 de una primidina y el C-4 de su vecino. **(b)** La formación de un dímero ciclobutano de pirimidina provoca un codo en el DNA. [Fuente: (b) PDB ID 1TTD, K. McAteer et al., *J. Mol. Biol.* 282:1013, 1998.]

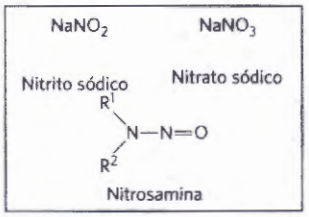
dar lugar a uracilo se produce en aproximadamente una de cada 10^7 residuos de citidina cada 24 h. Ello equivale a unas 100 mutaciones espontáneas por día en una célula de mamífero. La desaminación de la adenina y la guanina es aproximadamente 100 veces más lenta.

La lenta reacción de desaminación de la citosina parece inocua a primera vista, pero es casi con toda seguridad la causa de que el DNA contenga timina en lugar de uracilo. El producto de la desaminación de la citosina (uracilo) es reconocido rápidamente como extraño, y es eliminado por un sistema de reparación (Capítulo 25). Si el DNA contuviera normalmente uracilo, el reconocimiento de los uracilos procedentes de la desaminación de la citosina sería más difícil, y los uracilos no reparados darían lugar a cambios permanentes en la secuencia al aparearse con adeninas en la replicación. La desaminación de la citosina provocaría entonces una disminución gradual en la cantidad de pares de bases G≡C y un aumento en los A=U en el DNA de todas las células. A lo largo de milenios de evolución, la desaminación de la citosina podría acabar con los pares de bases G≡C y con el código genético que de ellos depende. Es posible que la fijación de la timina como una de las cuatro bases del DNA haya sido un momento crucial de la evolución, que hizo posible el almacenamiento de la información genética a largo plazo.

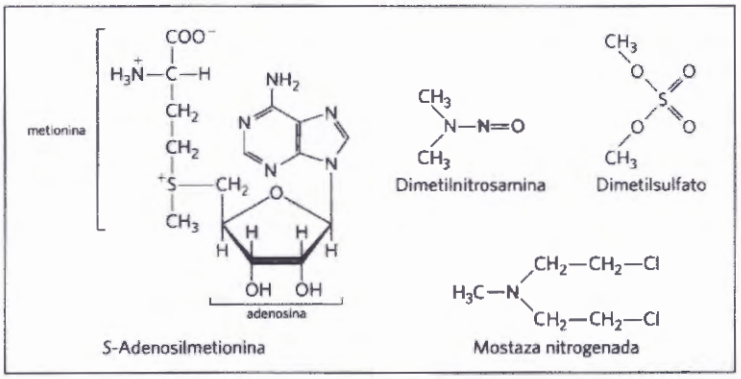
Otra reacción importante de los desoxirribonucleótidos es la hidrólisis del enlace *N*-β-glucosídico entre la base y la pentosa, que produce una lesión denominada sitio AP (apurínico, apirimidínico) o abásico (Fig. 8-29b). Esta reacción ocurre más fácilmente en las purinas que en las pirimidinas. En el DNA se pierde una de cada 10^5 purinas cada 24 h en condiciones celulares típicas (10.000 por célula de mamífero). La despurinación de los ribonucleótidos y del RNA es mucho más lenta y normalmente no se considera fisiológicamente significativa. En el laboratorio puede acelerarse la pérdida de purinas por tratamiento con ácido diluido. La incubación del DNA a pH 3 provoca la eliminación selectiva de las bases purínicas, y produce un derivado denominado ácido apurínico.

La radiación favorece otras reacciones. La luz UV induce la condensación de dos grupos etileno para formar un anillo de ciclobutano. En la célula, la misma reacción entre bases pirimidínicas adyacentes en los ácidos nucleicos da lugar a dímeros de pirimidina en ciclobutano. Estos se observan con mayor frecuencia entre residuos adyacentes de timina en la misma hebra del DNA **(Fig. 8-30)**. Un segundo tipo de dímero de pirimidina, llamado fotoproducto 6-4, también se forma durante la irradiación con luz UV. Las radiaciones ionizantes (rayos X y rayos gamma) pueden provocar la abertura de los anillos y la fragmentación de las bases, así como roturas en el esqueleto covalente de los ácidos nucleicos.

Prácticamente todas las formas de vida están expuestas a la acción de radiaciones de alta energía, capaces de provocar cambios químicos en el DNA. Se sabe que la radiación en la región del UV cercano (con longitudes de onda entre 200 y 400 nm), que representa una porción significativa del espectro solar, puede producir la dimerización de las pirimidinas y otros cambios químicos en el DNA de las bacterias y de las células cutáneas en humanos. Estamos expuestos a un campo permanente de radiación ionizante en forma de rayos cósmicos, que pueden penetrar profundamente en la tierra, así como a



(a) Precursores del ácido nitroso



(b) Agentes alquilantes

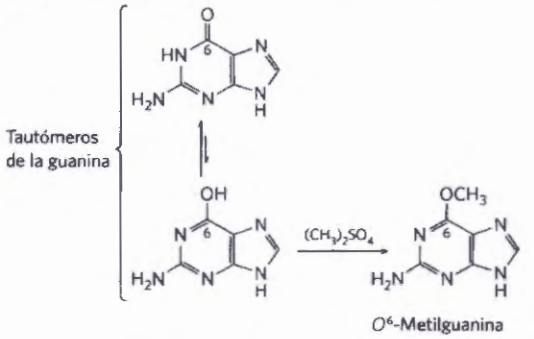
FIGURA 8-31 Agentes químicos que causan lesiones en el DNA. (a) Precursores del ácido nitroso que promueven reacciones de desaminación. **(b)** Agentes alquilantes. Sólo la *S*-adenosilmetionina actúa enzimáticamente.

radiación emitida por elementos radiactivos como radio, plutonio, uranio, radón, ^{14}C y ^{3}H. Los rayos X utilizados en exámenes médicos o dentales o en radioterapia en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades son otra forma de radiación ionizante. Se estima que la luz UV y las radiaciones ionizantes son responsables de aproximadamente el 10% del total de lesiones en la estructura del DNA causados por agentes medioambientales.

El DNA también puede sufrir daños causados por reactivos químicos introducidos en el medio ambiente por la actividad industrial. Estos productos pueden no ser peligrosos en sí mismos, pero su metabolización por las células puede convertirlos en productos que sí lo sean. Hay dos clases principales de este tipo de agentes **(Fig. 80-31)**: (1) agentes desaminantes, en particular el ácido nitroso (HNO_2) o compuestos que pueden dar lugar a la formación metabólica de ácido nitroso o nitritos, y (2) agentes alquilantes.

El ácido nitroso, formado a partir de precursores orgánicos tales como nitrosaminas y sales de nitrito y nitrato, es un reactivo que acelera poderosamente la desaminación de las bases. El bisulfito tiene efectos similares. Ambos compuestos se usan como conservantes en alimentos preparados para evitar el crecimiento de bacterias tóxicas. Parece ser que su utilización no aumenta significativamente el riesgo de cáncer, probablemente porque las cantidades empleadas son pequeñas y su efecto global sobre el DNA resulta despreciable. (Los riesgos potenciales para la salud a causa del deterioro que se produciría en los alimentos en el caso de que no se usaran estos conservantes son mucho mayores).

Los agentes alquilantes pueden alterar ciertas bases del DNA. Por ejemplo, el compuesto dimetilsulfato, altamente reactivo (Fig. 8-31b), puede metilar la guanina y dar lugar a O^6-metilguanina, que no puede aparearse con la citosina.



Muchas reacciones similares son producidas por agentes alquilantes normalmente presentes en las células, como por ejemplo la S-adenosilmetionina.

La causa principal de alteraciones mutagénicas en el DNA son los procesos oxidativos. Las especies que contienen oxígeno reactivo, tales como el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo y los radicales superóxido aparecen durante la irradiación o como productos secundarios del metabolismo aeróbico. De estas especies, los radicales hidroxilo son responsables de la mayor parte de las lesiones oxidativas del DNA. Las células poseen un elaborado sistema de defensa para destruir estas especies de oxígeno reactivas, del que forman parte enzimas tales como la catalasa y la superóxido dismutasa que convierten las especies reactivas de oxígeno en productos inofensivos. Sin embargo, una fracción de estos agentes oxidantes escapa inevitablemente a las defensas celulares y se producen lesiones en el DNA, que resultan de un conjunto amplio y complejo de reacciones que van desde la oxidación de la desoxirribosa y de las bases hasta la rotura de las hebras. Todavía no se dispone de estimaciones precisas del alcance de estas lesiones, pero está claro que el DNA de todas las células humanas está sometido cotidianamente a la acción de millares de reacciones oxidativas perjudiciales.

Lo que antecede es simplemente una muestra de las reacciones mejor conocidas que dañan al DNA. Muchos compuestos cancerígenos presentes en la comida, el agua o el aire ejercen sus efectos a través de la modificación de las bases del DNA. Sin embargo, la integridad del DNA como polímero se mantiene mejor que la del RNA o de las proteínas, gracias a que el DNA es la única macromolécula que posee importantes sistemas bioquímicos de reparación. Estos procesos de reparación (descritos en el Capítulo 25) amortiguan en gran medida el impacto de las lesiones del DNA. ■

Algunas bases del DNA están metiladas

Algunas bases del DNA experimentan con frecuencia metilación enzimática. La adenina y la citosina se encuentran metiladas con más frecuencia que la guanina y la timina. La metilación está restringida generalmente a ciertas secuencias o regiones de la molécula de DNA. En algunos casos se conoce bien la función de la metilación; en otros es todavía desconocida. Todas las DNA-metilasas conocidas utilizan *S*-adenosilmetionina como dador de grupos metilo (Fig. 8-31b). *E. coli* dis-

pone dos sistemas de metilación principales. Uno de ellos actúa como parte de un mecanismo de defensa celular que ayuda a distinguir el DNA propio del DNA ajeno marcando su DNA propio con grupos metilo y destruyendo el DNA (ajeno) sin grupos metilo (conocido como mecanismo de restricción-modificación; véase la p. 322). El otro sistema metila los residuos de adenosina en la secuencia (5')GATC(3'), convirtiéndola en N^6-metiladenina (Fig. 8-5a). Este proceso está catalizado por la metilasa Dam (*m*etilación de la *a*denina del *D*NA), que funciona como parte de un sistema de reparación de pares de bases incorrectos formados ocasionalmente durante la replicación del DNA (véase la Fig. 25-21).

En las células eucarióticas, aproximadamente el 5% de los residuos de citidina del DNA están metilados en forma de 5-metilcitidina (Fig. 8-5a). La metilación es muy frecuente en las secuencias CpG, lo que origina grupos metil-CpG simétricos en ambas hebras del DNA. El grado de metilación de las secuencias CpG varía según la región en las grandes moléculas del DNA eucariótico.

La síntesis química de DNA ha sido automatizada

Otra de las tecnologías que ha favorecido el progreso de la química de los ácidos nucleicos es la síntesis química de oligonucleótidos cortos de secuencia conocida. H. Gobind Khorana y colaboradores fueron los primeros en desarrollar estos métodos en la década de 1970. El método más utilizado en la actualidad, denominado método de las fosforamiditas, fue desarrollado por Robert Letsinger and Marvin Caruthers **(Fig. 8-32)**. La síntesis se lleva a cabo con la cadena en crecimiento unida a un soporte sólido, y se basa en principios similares a los empleados por Merrifield para la síntesis de péptidos (véase la Figura 3-32) y está totalmente automatizada. La eficiencia de cada paso de adición es muy elevada, lo que hace posible sintetizar rutinariamente polímeros de 70 u 80 nucleótidos, y en algunos laboratorios, cadenas mucho más largas. La disponibilidad de polímeros de DNA con secuencias previamente diseñadas y a precios relativamente asequibles ha tenido un gran impacto en todas las áreas de la bioquímica.

Las secuencias génicas pueden amplificarse con la reacción en cadena de la polimerasa

Los proyectos Genoma, como los descritos en el Capítulo 9, han generado bases de datos internacionales que contienen las secuencias genómicas completas de centenares de organismos. Si se conoce al menos la secuencia de la parte de los extremos del segmento de DNA que se desea clonar, el número de copias de este segmento de DNA puede ser amplificado enormemente mediante la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, técnica ideada por Kary Mullys en 1983. El DNA amplificado puede ser usado en una amplia variedad de procesos.

El procedimiento de la PCR, descrito en la **Fig. 8-33**, se basa en el uso de enzimas llamadas **DNA polimerasas**. Estos enzimas sintetizan cadenas de DNA a partir de desoxirribonucleótidos y un molde de DNA (Capítulo 25). Las DNA polimerasas no sintetizan DNA de novo, en cambio, añaden nucleótidos a cadenas preexistentes, denominadas **cebadores** (véase el Capítulo 25). En la PCR, se preparan dos oligonucleótidos sintéticos, cada uno complementario de secuencias en las hebras opuestas del DNA diana, situadas justo en los extremos del segmento que se quiere amplificar. Los oligonucleótidos sirven de cebadores para la replicación y pueden ser alargados por una DNA polimerasa. Los extremos 3' de los cebadores hibridados están orientados uno hacia otro y posicionados para cebar la síntesis de DNA a lo largo del segmento de DNA deseado.

La PCR es un procedimiento de una gran simplicidad. La PCR básica requiere cuatro componentes: una muestra de DNA que contenga el segmento que debe amplificarse, la pareja de oligonucleótidos sintéticos que actúan de cebadores, desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) y DNA polimerasa. El proceso consta de tres etapas (Fig. 8-33). En la etapa ❶ la mezcla de reacción se calienta brevemente para desnaturalizar el DNA con lo que se separan las dos cadenas. En la etapa ❷, La mezcla se enfría para que los cebadores puedan hibridar con el DNA. La elevada concentración de cebadores aumenta la probabilidad de que estos puedan hibridar con cada cadena de DNA desnaturalizado antes de que las dos cadenas de DNA (presentes a una concentración mucho menor) puedan hibridar entre sí. En la etapa ❸, el segmento de DNA que ha sido cebado es replicado selectivamente por la DNA polimerasa utilizando los dNTP. El ciclo de calentamiento, enfriamiento y replicación se repite 25 o 30 veces en unas pocas horas por medio de un proceso automatizado que amplifica el segmento de DNA flanqueado por los cebadores hasta que pueda ser analizado o clonado fácilmente. Cada ciclo aumenta la cantidad del segmento de DNA en un factor de 2, por lo que la concentración de este DNA aumenta exponencialmente. Después de 20 ciclos, el segmento de DNA ha sido amplificado más de un millón de veces (2^{20}); después de 30 ciclos, más de 1000 millones de veces. La etapa ❸ de la PCR utiliza una polimerasa termoestable, como la polimerasa Taq, aislada de una bacteria termófila (Thermus aquaticus) que crece en fuentes termales, cuya temperatura se aproxima al punto de ebullición del agua. La polimerasa Taq permanece activa después de cada ciclo de calentamiento (etapa ❶), y no tiene que ser repuesta.

Esta tecnología posee una gran sensibilidad: la PCR puede detectar y amplificar hasta una sola molécula de DNA en casi cualquier tipo de muestra, incluso algunas antiguas. La doble hélice del DNA es muy estable, pero como hemos visto, el DNA se degrada lentamente con el tiempo a través de varias reacciones no enzimáticas. Sin embargo, la PCR se ha hecho posible clonar fragmentos muy escasos de DNA de más de 40.000 años de antigüedad. Esta técnica se ha utilizado para clonar fragmentos de DNA procedentes de restos humanos momificados y de animales extintos tales como los mamuts lanudos; se han abierto, así, nuevas posibilidades para la arqueología y la paleontología moleculares. El DNA obtenido en las necrópolis ha sido amplificado con la PCR y se ha usado para seguir antiguas migraciones humanas (véase la Fig. 9-33). La epidemiología puede utilizar muestras amplificadas por PCR a partir de restos humanos para seguir la evolución de virus humanos patógenos. Así, además de su utilidad para clonar DNA, la PCR es una poderosa herramienta en medicina forense (Recuadro 8-1). También

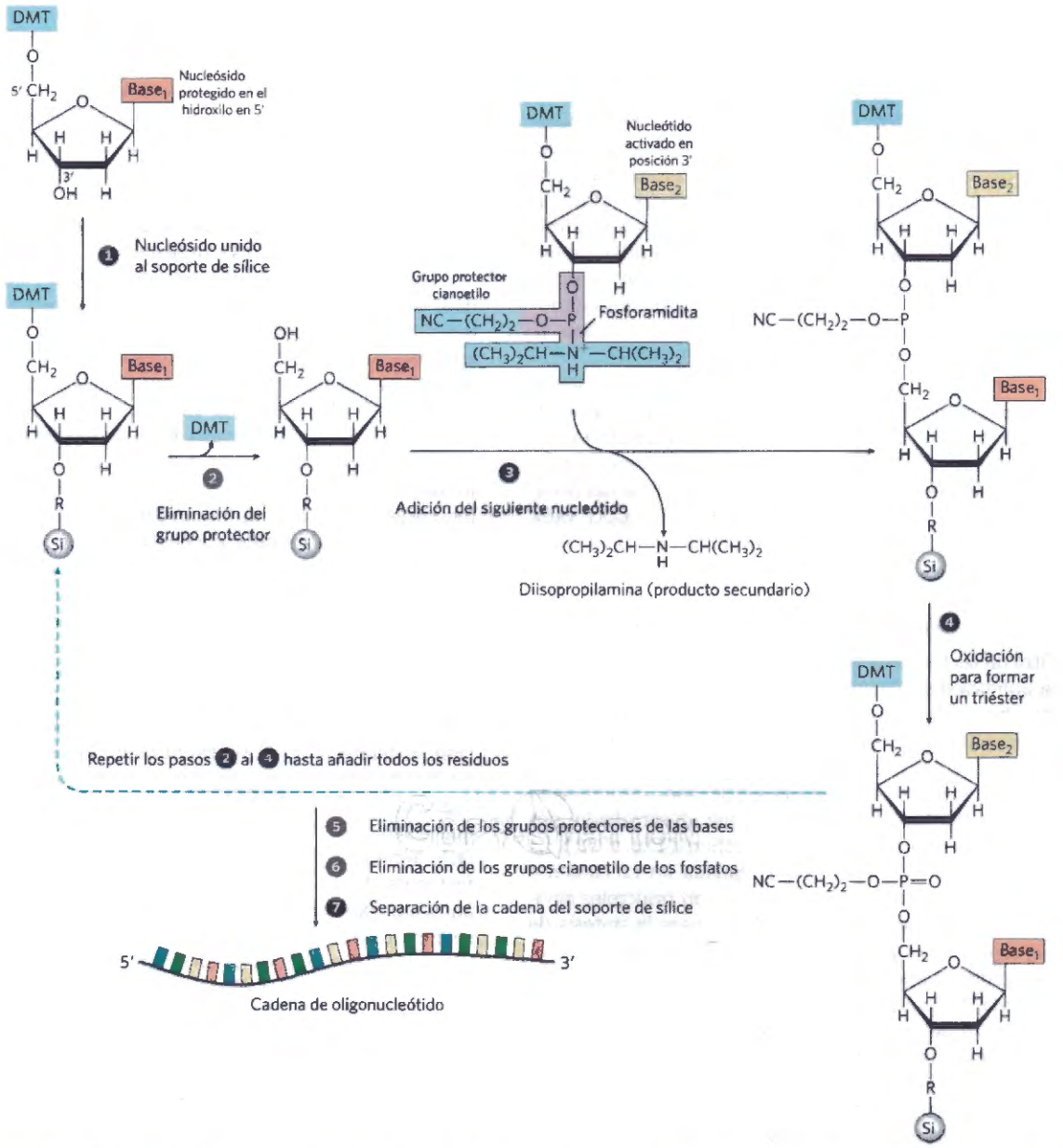
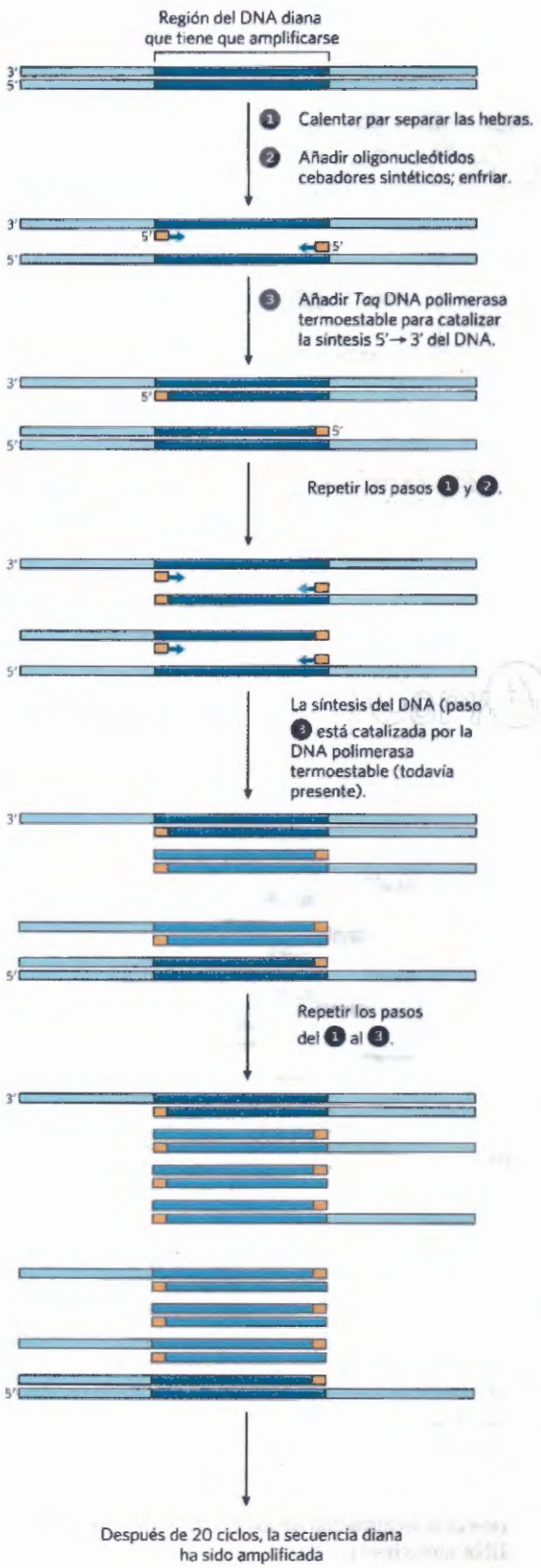


FIGURA 8-32 Síntesis química de DNA por el método de las fosforamiditas. La síntesis automatizada de DNA es conceptualmente análoga a la síntesis de polipéptidos sobre un soporte sólido. El oligonucleótido deseado se construye sobre un soporte sólido (sílice) nucleótido a nucleótido mediante la repetición de una serie de reacciones químicas con los precursores de los nucleótidos adecuadamente protegidos. ❶ El primer nucleótido (que será el extremo 3') se une al soporte de sílice por el grupo 3' hidroxilo (a través de un grupo de unión, R), y su grupo hidroxilo en 5' está protegido por un grupo dimetoxitritilo (DMT) que es ácido-lábil. Los grupos reactivos de todas las bases también están protegidos químicamente. ❷ El grupo protector DMT es eliminado mediante lavado de la columna con ácido (el grupo DMT es coloreado por lo que la reacción puede seguirse espectrofotométricamente). ❸ El siguiente nucleótido lleva una fosforamidita reactiva en la posición 3': un fosfito trivalente (en lugar del fosfato pentavalente más oxidado, normalmente presente en los ácidos nucleicos) con un oxígeno unido reemplazado por un grupo amino o una amina sustituida. En la variante más común representada, uno de los oxígenos de la fosforamidita se une a la desoxirribosa, el otro está protegido por un grupo cianoetilo, y la tercera posición está ocupada por un grupo diisopropilamino fácilmente desplazable. La reacción con el nucleótido inmovilizado forma un enlace 5',3', y se elimina el grupo isopropilamino. En el paso ❹ el enlace fosfito se oxida con yodo para generar un enlace fosfotriéster. Las reacciones ❷ a ❹ se repiten hasta añadir todos los nucleótidos. En cada paso el exceso de nucleótido es eliminado con anterioridad a la adición del siguiente nucleótido. En los pasos ❺ y ❻ se eliminan los grupos protectores sobrantes de las bases y de los fosfatos, y en el paso ❼ se separan los oligonucleótidos del soporte sólido y, finalmente, se purifican. La química de la síntesis de RNA es algo más compleja a causa de la necesidad de proteger el grupo hidroxilo en 2' de la ribosa sin que se produzcan efectos adversos en la reactividad del grupo hidroxilo en 3'.

está siendo usada en la detección de infecciones víricas antes de la aparición de los primeros síntomas, así como en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas.



La extrema sensibilidad de los métodos basados en la PCR hace que la contaminación de las muestras sea un serio problema a considerar. En muchas aplicaciones, como los exámenes forenses o de DNA antiguo, es necesario incluir muestras control para asegurar que el DNA amplificado no procede del propio investigador o de bacterias contaminantes.

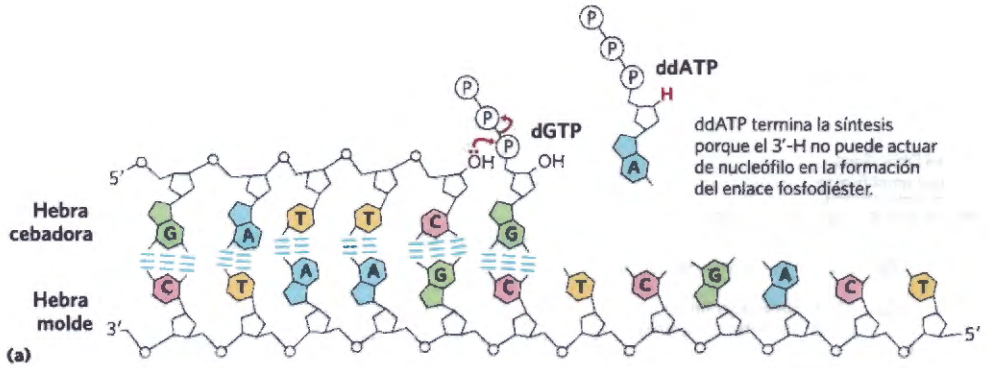
Se pueden determinar las secuencias de largas cadenas de DNA

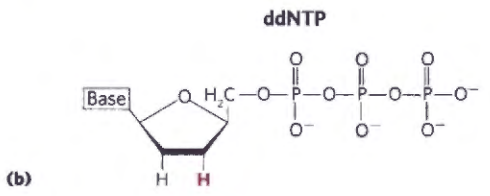
La propiedad más importante del DNA como depositario de la información genética es su secuencia de nucleótidos. Hasta finales de la década de 1970, determinar la secuencia de un ácido nucleico de tan sólo cinco o diez nucleótidos era una tarea difícil y laboriosa. El desarrollo de dos nuevas técnicas en el año 1977 una por Alan Maxam y Walter Gilbert y la otra por Frederick Sanger) hizo posible la secuenciación de moléculas de DNA muy largas. Estas técnicas se desarrollaron gracias a una mejor comprensión de la química de los nucleótidos y del metabolismo del DNA y a métodos electroforéticos que permiten la separación de hebras de DNA que difieren en un solo nucleótido. (véase la Fig. 3-18 para una descripción de la electroforesis en gel).

Aunque los dos métodos son similares, el **método de Sanger**, conocido también como método de los didesoxi, resultó más fácil técnicamente y se convirtió en el fundamento de los protocolos modernos de secuenciación **(Fig. 8-34)**. Se basa en la síntesis de una nueva hebra de DNA. Como la PCR, el método usa DNA polimerasas y un cebador para sintetizar una cadena de DNA complementaria de la hebra molde. En la secuenciación de Sanger, la secuencia obtenida corresponde a la hebra de nueva síntesis, complementaria de la hebra molde que se está analizando.

En la reacción catalizada por la DNA polimerasa, el grupo 3' hidroxilo reacciona con un dNTP para formar un nuevo enlace fosfodiéster (Fig. 8-34a). En la reacción de secuenciación de Sanger, análogos de los nucleótidos, llamados dideoxinucleosido trifosfatos (ddNTP), interrumpen la síntesis del DNA porque se unen a la hebra molde, pero carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para añadir el siguiente nucleótido (Fig. 8-34b). Por ejemplo, al añadir una pequeña cantidad de ddCTP a una reacción que contenga una cantidad mucho mayor de dCTP (junto con los otros tres dNTP) se produce competición cada vez que la polimerasa topa con una G en la hebra molde. Normalmente, se añade dC y la síntesis de la otra hebra continúa. En cambio, ocasionalmente se añadirá ddC y la síntesis de la hebra se detendrá en esta posición. Por tanto, una

FIGURA 8-33 Amplificación de un fragmento de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (a) El procedimiento de la PCR tiene tres pasos. 1 Se separan las cadenas de DNA por calentamiento, a continuación 2 se hibridan con un exceso de cebadores de DNA sintético cortos (naranja), que flanquean la región que se desea amplificar (azul oscuro); 3 el DNA nuevo se sintetiza por polimerización catalizada por la DNA polimerasa. La DNA polimerasa termoestable *Taq* no se desnaturaliza en los períodos de calentamiento. Los tres pasos se repiten unos 25 o 30 ciclos en un procedimiento automatizado realizado en un pequeño instrumento de sobremesa denominado termociclador.





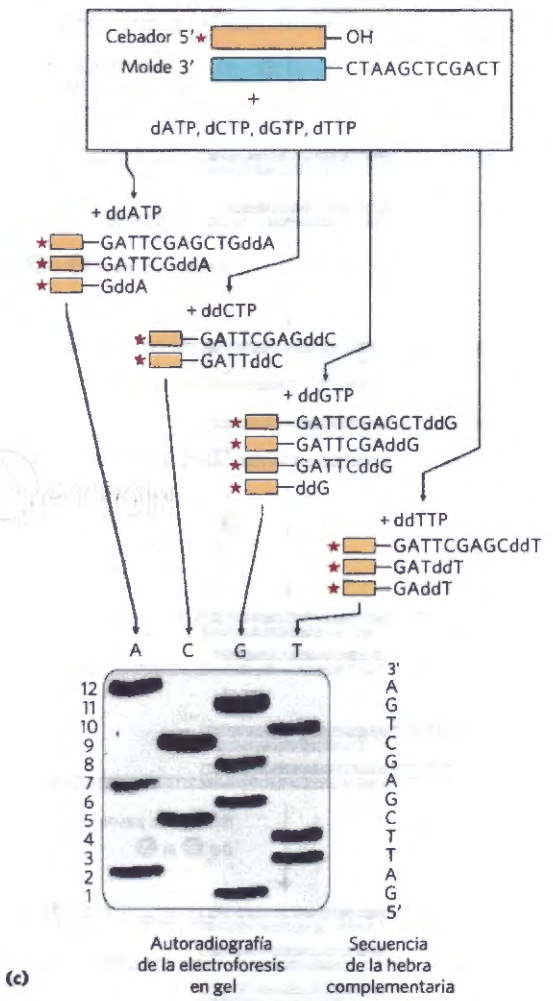


FIGURA 8-34 Secuenciación del DNA por el método de Sanger. Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA por las DNA polimerasas (Capítulo 25). **(a)** Las DNA polimerasas requieren a la vez un cebador (una cadena oligonucleotídica corta) a la que se añaden los nucleótidos y una hebra molde que dirija la selección de cada nuevo nucleótido. En las células, el grupo hidroxilo en 3' del cebador reacciona con el desoxinucleósido entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. **(b)** El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) para interrumpir la síntesis del DNA. (El método de Sanger también es conocido como el método de los didesoxi). Cuando se inserta un ddNTP en lugar de un dNTP se detiene el alargamiento de la cadena después de la adición del análogo porque éste carece del grupo hidroxilo en 3', necesario para el siguiente paso. **(c)** El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto, marcado con radiactividad o con fluorescencia. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, a un sistema de reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán prematuramente su crecimiento en algunas posiciones en las que normalmente se encuentra dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP en relación a ddCTP, la probabilidad de que se incorpore el análogo en los casos en que deba incorporarse dC es pequeña. Sin embargo, la cantidad de ddCTP es suficientemente grande para asegurar que cada nueva hebra sintetizada incorpore al menos un ddC en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos marcados acabados en un residuo C. Cada residuo C en la secuencia genera un conjunto de fragmentos de una longitud determinada, de forma que el tamaño de los fragmentos, separados por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los cuatro ddNTP, y la secuencia puede leerse directamente de una autorradiografía del gel. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, de manera que los más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de los nucleótidos más cercanos al cebador (extremo 5') y la secuencia se lee de abajo arriba (en la dirección 5'— 3'). Observe que la secuencia obtenida corresponde a la hebra *complementaria* de aquella que está siendo analizada.

pequeña fracción de las hebras sinterizadas terminan prematuramente en todas las posiciones donde normalmente se añadiría dC en frente de cada dG del molde, Dado el exceso de dCTP en relación con el ddCTP, la probabilidad de que el análogo se incorpore en lugar del dCTP es pequeña. Pero el ddCTP presente es suficiente para asegurar que cada hebra nueva adquiera al menos un ddC en algún punto (en uno u otro de los residuos G del molde) durante la síntesis. El resultado es una mezcla de fragmentos todos ellos acabados con un residuo ddC. Cada residuo G del molde genera fragmentos acabados en C de una determinada longitud. El diferente tamaño de los fragmentos separados por electroforesis revela la localización de los residuos de C en la hebra de DNA sintetizada.

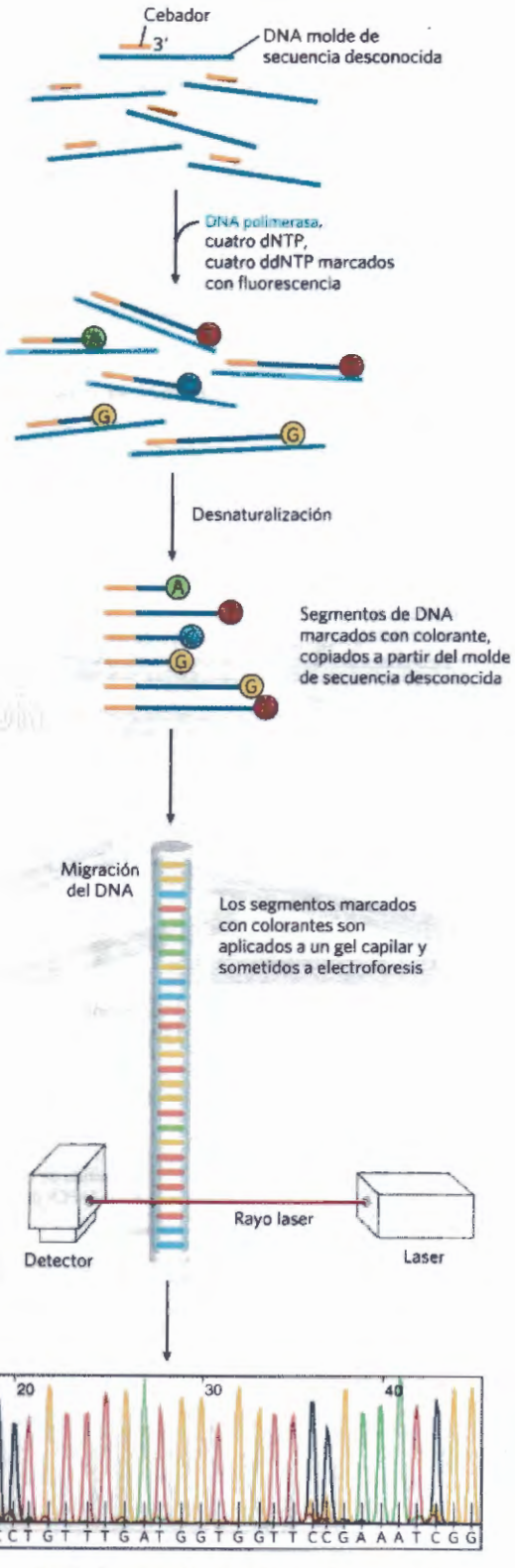
Cuando este procedimiento fue ideado, el proceso se repetía separadamente para cada uno de los cuatro ddNTPC. Cebadores marcados con radioactividad hacían posible la detección de los fragmentos de DNA generados durante las reacciones de síntesis. La secuencia de la hebra de DNA sintetizada se leía directamente de una autorradiografía del gel resultante (Fig. 8-34c). Puesto que los fragmentos de DNA más cortos migran más rápido, los fragmentos cerca de la base del gel representaban las posiciones de los nucleótidos más cercanas al cebador (el extremo 5') y la secuencia se leía (en la dirección 5' → 3') de abajo arriba.

La secuenciación de DNA fue automatizada mediante una modificación del método de Sanger, en la cual cada uno de los cuatro ddNTP utilizados en una reacción fue marcado con una etiqueta fluorescente de diferente color **(Fig. 8-35)**. Con esta tecnología los cuatro dNTP pudieron añadirse a la vez a una única reacción, y así secuenciar moléculas de DNA con millares de nucleótidos en pocas horas. Los genomas completos de centenares de organismos fueron secuenciados de este modo. Por ejemplo, en el Proyecto del Genoma Humano fueron secuenciados en su totalidad los 3,2 x 109 pares de bases (pb) del DNA de una célula humana (véase el Capítulo 9), en un esfuerzo que se extendió a lo largo de una década y que incluyó las contribuciones de docenas de laboratorios de todo el mundo. Esta modalidad del método de Sanger todavía se usa para secuenciar fragmentos cortos de DNA.

Las técnicas de secuenciación de DNA avanzan con rapidez

Las **técnicas de secuenciación de DNA** continúan evolucionando. Un genoma humano completo puede secuenciarse en la actualidad en uno o dos días y un genoma bacteriano en unas pocas horas. Con un gasto moderado, la secuencia genómica personal pronto podrá formar parte de la historia clínica. Estos avances han sido posibles gracias a métodos a veces designados como secuenciación de nueva generación. La estrategia de secuenciación es a veces similar y a veces muy distinta de la usada en el método de Sanger. El procedimiento ha podido miniaturizarse, con un incremento masivo de escala y la correspondiente disminución del coste.

Una secuencia genómica se genera en varias etapas. Primero, las secuencias genómicas se rompen en localizaciones al azar mediante fuerzas de cizalla que generan fragmentos de unos pocos centenares de pares de bases de longitud. Se ligan oligonucleótidos sintéticos al extremo de todos los fragmentos para introducir un punto de referencia conocido en cada molécula de DNA. A conti-



Resultados generados por ordenador después de que las bandas de migración hayan pasado por el detector

FIGURA 8-35 Automatización de las reacciones de secuenciación del DNA. Los oligonucleótidos cortos usados como cebadores para la síntesis de DNA en el método de Sanger pueden unirse a una molécula fluorescente que confiere a todos los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los cuatro ddNTP se añaden a un único tubo. Los fragmentos de DNA coloreado resultantes se separan a continuación por tamaño mediante electroforesis en un único gel contenido en un tubo capilar (una modalidad electroforética que permite separaciones más rápidas). Todos los fragmentos de una longitud determinada migran a través del gel en un solo pico y el color asociado a cada una de ellos se detecta utilizando un rayo láser. La secuencia del DNA se lee a partir de la secuencia de los colores de los picos a medida que van pasando por el detector, y la información obtenida se envía directamente a un ordenador que determina la secuencia.

RECUADRO 8-1 Un arma poderosa en la medicina forense

Uno de los métodos más exactos para situar a un individuo en la escena de un crimen ha sido la toma de huellas dactilares. La tecnología del DNA recombinante ha hecho posible un método mucho más poderoso: el **genotipado del DNA** (también denominado huella dactilar del DNA o tipificación del DNA). El método se basa en los **polimorfismos de secuencia**: pequeñas diferencias en las secuencias de diferentes individuos aproximadamente, uno de cada 1.000 de pares de bases. El método fue descrito por primera vez por el genético inglés Alec Jeffreys en 1985. Cada diferencia con respecto a la secuencia consenso del genoma humano (el primero en ser obtenido) está presente en una parte de la población humana; todos los individuos presentan algunas diferencias en relación al prototipo.

El moderno trabajo forense se basa en diferencias de longitud de las **repeticiones cortas en tándem (STR).** Una STR es una secuencia de DNA corta repetida muchas veces en tándem en un lugar determinado de un cromosoma; comúnmente las secuencias repetidas tienen 4 pb de longitud. Los loci STR más útiles para el tipificado del DNA son bastante cortos, de 4 a 50 repeticiones (de 16 a 200 pares de bases para repeticiones de cuatro nucleótidos) y presentan múltiples variantes de longitud en la población humana. Más de 20000 loci STR de tetranucleótidos han sido caracterizados, y más de un millón de STR de todo tipo pueden estar presentes en el genoma humano, representando alrededor del 3% de todo el DNA humano.

La longitud de una determinada STR de un individuo puede averiguarse con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (véase la Fig. 9-12). El uso de la PCR hace que el procedimiento sea suficientemente sensible para aplicarlo a muestras de DNA tan pequeñas como las que a menudo se recogen en los escenarios de un crimen. Las secuencias de DNA que flanquean las STR son únicas para cada locus STR e idénticas (excepto en casos excepcionales) para todos los humanos. Los cebadores para la PCR son complementarios del DNA flanqueante y están diseñados para amplificar la STR (Fig. 1a). La longitud del producto de la PCR refleja, pues, la longitud de la

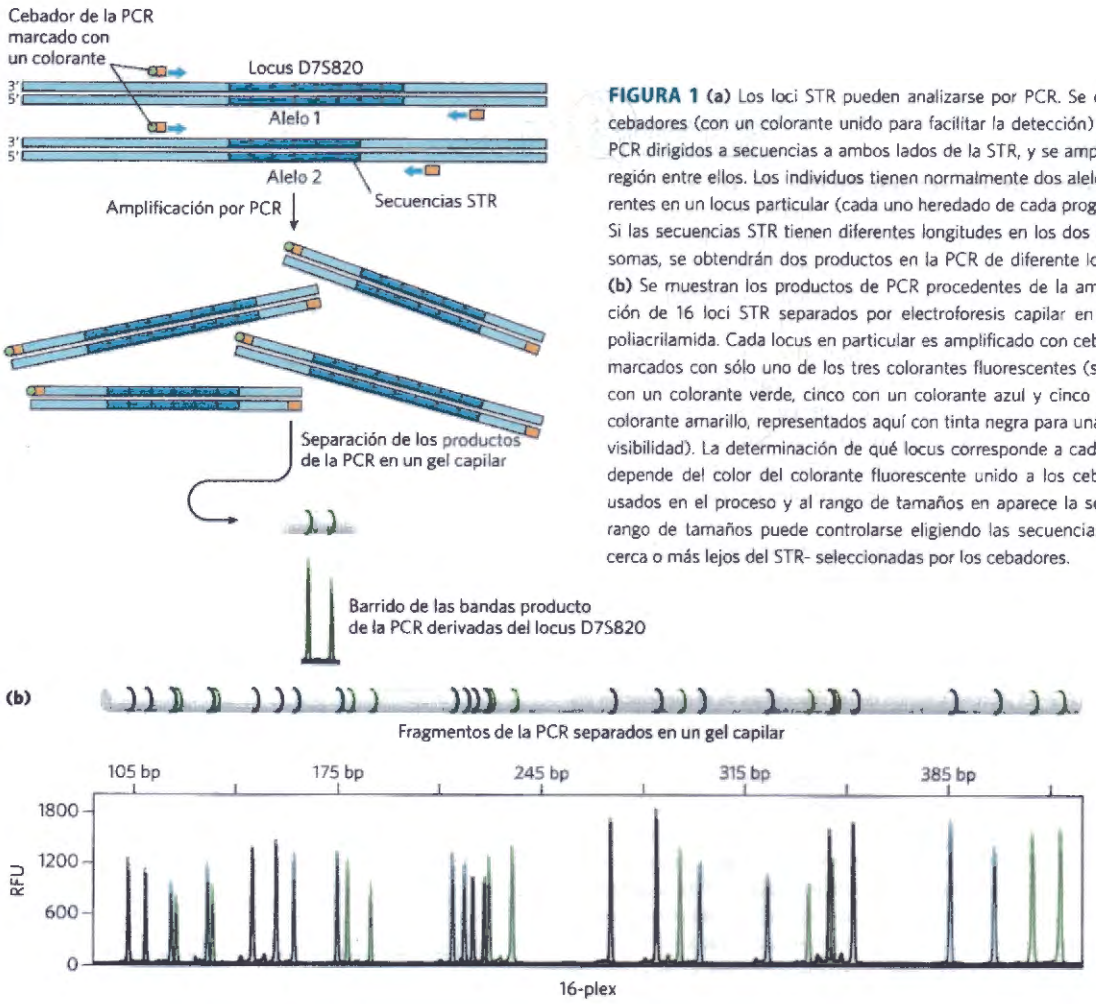


FIGURA 1 **(a)** Los loci STR pueden analizarse por PCR. Se diseñan cebadores (con un colorante unido para facilitar la detección) para la PCR dirigidos a secuencias a ambos lados de la STR, y se amplifica la región entre ellos. Los individuos tienen normalmente dos alelos diferentes en un locus particular (cada uno heredado de cada progenitor). Si las secuencias STR tienen diferentes longitudes en los dos cromosomas, se obtendrán dos productos en la PCR de diferente longitud. **(b)** Se muestran los productos de PCR procedentes de la amplificación de 16 loci STR separados por electroforesis capilar en gel de poliacrilamida. Cada locus en particular es amplificado con cebadores marcados con sólo uno de los tres colorantes fluorescentes (seis loci con un colorante verde, cinco con un colorante azul y cinco con un colorante amarillo, representados aquí con tinta negra para una mejor visibilidad). La determinación de qué locus corresponde a cada señal depende del color del colorante fluorescente unido a los cebadores usados en el proceso y al rango de tamaños en aparece la señal (el rango de tamaños puede controlarse eligiendo las secuencias -más cerca o más lejos del STR- seleccionadas por los cebadores.

STR de la muestra. Puesto que cada ser humano hereda un cromosoma de cada progenitor, las longitudes de la STR de los dos cromosomas son a menudo diferentes y dan lugar a dos señales para cada individuo. Los productos de la PCR se analizan por electroforesis capilar. Las bandas resultantes se convierten en un conjunto de picos que reflejan con precisión el tamaño de cada fragmento de la PCR y, por lo tanto, de la longitud de la STR en el alelo correspondiente. Si se analizan múltiples loci puede generarse un perfil que es esencialmente único para un individuo en particular (Fig. 1b). Se dispone de kits comerciales que contienen los cebadores para la PCR específicos para cada locus, unidos a colorantes que permiten distinguir los diferentes productos de la PCR. La amplificación por PCR permite obtener huellas de DNA a partir de menos de 1 ng de DNA parcialmente degradado, cantidad que puede obtenerse de un único folículo piloso, una gota de sangre, una pequeña muestra de semen, que pueden tener meses o incluso años. Cuando se obtienen buenos genotipos de STR, la probabilidad de una identificación errónea es menor de una en 10^{18}.

El análisis de STR para uso forense requiere su estandarización. El primer estándar forense de STR se estableció en el Reino Unido en 1995. El estándar de Estados Unidos, denominado Sistema de Indexado Combinado de DNA (CODIS), se estableció en 1998. El sistema CODIS se basa en 13 loci STR bien estudiados (Tabla1), que deben estar presentes en cualquier experimento de tipificación de DNA realizado en Estados Unidos. El gen de la amelogenina se usa de marcador. Este gen, presente en los cromosomas sexuales humanos, tiene secuencias flanqueantes ligeramente diferentes en los cromosomas X e Y. La amplificación por PCR a lo largo del gen de la amilogenina genera, por lo tanto, productos de diferente tamaño que pueden revelar el sexo del DNA donante. A principios del 2010, la base de datos de CODIS contenía más de 7 millones de genotipos STR y había contribuido a más de 100.000 investigaciones forenses.

Estos análisis han servido tanto para condenar como para absolver sospechosos y para establecer la paternidad con un alto grado de confianza. El impacto de esta tecnología en los procedimientos judiciales continuará creciendo, conforme se llegue a acuerdos sobre las condiciones de su uso y los métodos se divulguen entre los laboratorios forenses. Casos que han permanecido sin resolver, incluso durante décadas, pueden ser investigados con estas técnicas: en 1996 se usó la huella del DNA para confirmar la identificación de los huesos del último zar de Rusia y de su familia, asesinados en 1918.

TABLA 1 Nomenclatura de los nucleótidos y los ácidos nucleicos

Locus	Cromosoma	Motivo repetido	Longitud de la repetición (Rango)[a]	Numero de alelos observado[b]
CSF1PO	5	TAGA	5–16	20
FGA	4	CTTT	12,2–51,2	80
TH01	11	TCAT	3–14	20
TPOX	2	GAAT	4–16	15
VWA	12	[TCTG][TCTA]	10–25	28
D3S1358	3	[TCTG][TCTA]	8–21	24
D5S818	5	AGAT	7–18	15
D7S820	7	GATA	5–16	30
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	7–20	17
D13S317	13	TATC	5–16	17
D16S539	16	GATA	5–16	19
D18S51	18	AGAA	7–39,2	51
D21S11	21	[TCTA][TCTG]	12–41,2	82
Amelogenin[c]	X, Y	No aplicable		

Fuente: adaptado de Data from J. M. Butler, *Forensic DNA Typing*, 2nd edn, Elsevier, 2005, p. 96

[a]Longitud de las repeticiones observadas en la población humana. Algunos alelos pueden contener repeticiones parciales o imperfectas.

[b]Número de alelos distintos observados hasta 2005 en la población humana. El análisis concienzudo de un locus en muchos individuos °es indispensable antes de su uso en el genotipado forense

[c]La amelogenina es un gen cuya longitud es ligeramente diferente en los cromosomas X e Y, que se usa para determinar el género.

nuación, se inmovilizan los fragmentos individuales sobre una superficie sólida y cada uno se amplifica por PCR. La superficie sólida forma parte de un canal, que permite que disoluciones líquidas fluyan sobre las muestras. El resultado es una superficie sólida de unos pocos centímetros, con millones de agrupamientos de DNA unidos. Cada agrupamiento contiene múltiples copias de una secuencia de DNA única derivada de uno de los fragmentos al azar del DNA genómico. La eficiencia resulta de la secuenciación simultánea de estos millones de agrupamientos y de la captura y almacenamiento en un ordenador de los datos de cada agrupamiento.

Los dos métodos de secuenciación de nueva generación más comunes usan estrategias diferentes para llevar a cabo las reacciones de secuenciación. En ambos casos, la secuencia obtenida corresponde a la hebra de nueva síntesis, complementaria de las hebras molde que se están analizando. Uno de los métodos, conocido como secuenciación 454 (los números se refieren al código utilizado en la fase de desarrollo de la tecnología y carecen de significado científico), usa la estrategia denominada de **pirosecuenciación**, en la cual la adición de nucleótidos se detecta con destellos de luz **(Fig. 8-36)**. Los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (no modificados) entran en contacto con la superficie reactiva de uno en uno, en orden repetitivo. La disolución de nucleótido se mantiene en contacto con la superficie sólo el tiempo necesario para que la DNA polimerasa añada este nucleótido a cualquier agrupamiento donde sea complementario a la siguiente base de la secuencia molde. El exceso de nucleótido se destruye rápidamente por el enzima apirasa antes de introducir el siguiente nucleótido. Cuando un nucleótido específico se une a las hebras del agrupamiento se libera pirofosfato como subproducto. El enzima sulfurilasa usa el pirofosfato para convertir la adenosina 5'-fosfosulfato del medio en ATP. La aparición de ATP suministra finalmente la señal que indica que un nucleótido se ha añadido al DNA. La luciferasa y su sustrato, la luciferina (la luciferasa es el enzima que genera la luz producida por las luciérnagas; véase el Recuadro 13-1) también están presentes en el medio. Cuando se genera ATP, la luciferasa cataliza la reacción con la luciferina, que produce un minúsculo destello de luz. Cuando se producen muchos destellos en un agru-

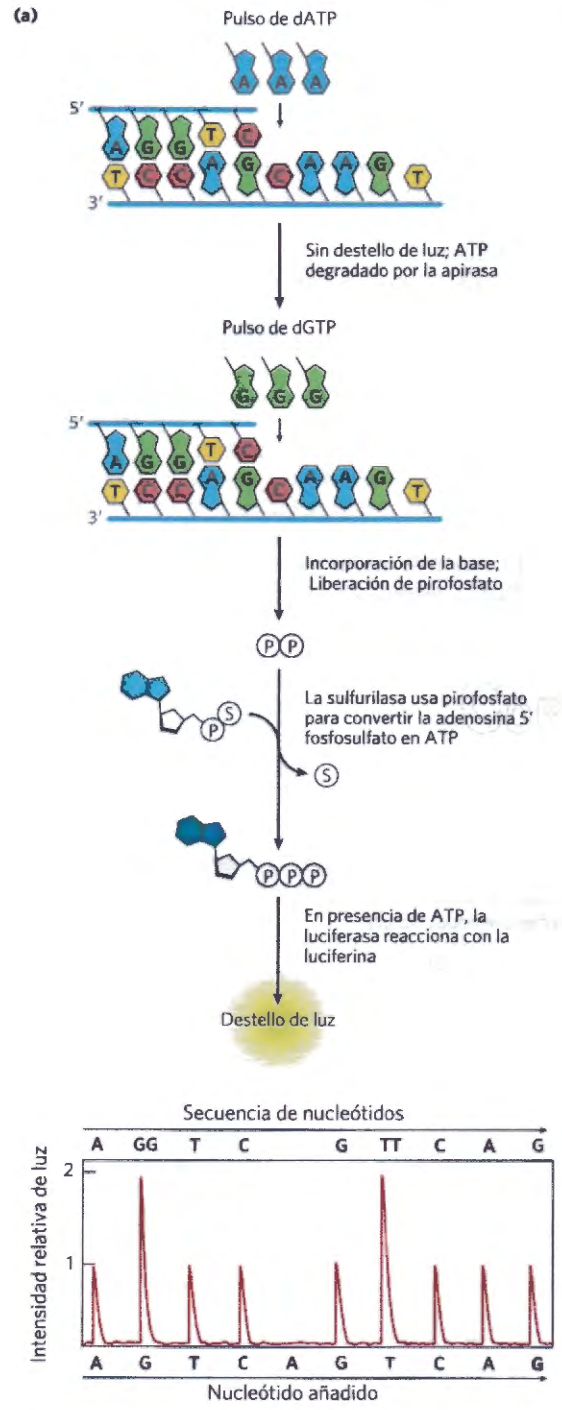


FIGURA 8-36 Pirosecuenciación de nueva generación (a) La pirosecuenciación utiliza los enzimas sulfurilasa (véase la Fig.22-15) y luciferasa (véase el recuadro 13-1) para detectar la adición de nucleótidos con destellos de luz. La gráfica muestra las intensidades de luz observadas en sucesivos ciclos de secuenciación de un segmento de DNA inmovilizado en un determinado punto de la placa y (arriba) la secuencia de nucleótidos del DNA que de ellas se deriva. **(b)** Imagen de una muy pequeña parte de un ciclo de secuenciación. Cada segmento individual de DNA a secuenciar se une a pequeña partícula esférica para la captura de DNA y a continuación se amplifica sobre la partícula por PCR. Cada partícula se sumerge en una emulsión y se coloca en un minúsculo pocillo de una placa de picotitración. La reacción de la luciferina y el ATP con la luciferasa produce destellos de luz cuando se añade un nucleótido a un determinado acúmulo de DNA en un determinado pocillo. Los círculos representan el mismo cluster a lo largo de múltiples ciclos. En este caso, leyendo el círculo de arriba (o de abajo) de izquierda a derecha a través de cada fila se obtiene la secuencia de este acúmulo.

pamiento, se puede registrar la luz emitida. Por ejemplo, cuando se añade dCTP a la disolución, se producirán destellos solamente en los agrupamientos donde G esté presente en el molde y C será el siguiente nucleótido añadido a la cadena de DNA en crecimiento. Si hay una serie de 2, 3, o 4 residuos de G en el molde, en un ciclo se añadirán el mismo número de residuos C a la cadena en crecimiento. Ello se registrará como un destello cuya amplitud en este agrupamiento será 2, 3 o 4 veces mayor que cuando se añada un solo residuo de C. De modo similar, cuando se añada dGTP, los destellos ocurrirán en un conjunto diferente de agrupamientos, indicando aquellos en los que G es el siguiente nucleótido añadido a la secuencia. La longitud de DNA que puede secuenciarse de forma fiable en un agrupamiento determinado mediante este método, a menudo denominada longitud de lectura o "lectura", es típicamente de 400 a 500 nucleótidos y, continúa mejorando.

El segundo método de nueva generación ampliamente utilizado recurre a la técnica del denominado **terminador reversible (Fig. 8-37),** que emplea el secuenciador Illumina. Una vez fragmentadas las secuencias genómicas y los oligonucleótidos de secuencia conocida unidos a los extremos, los segmentos de DNA se inmovilizan sobre una superficie sólida y se amplifican in situ por PCR. A continuación se añade un

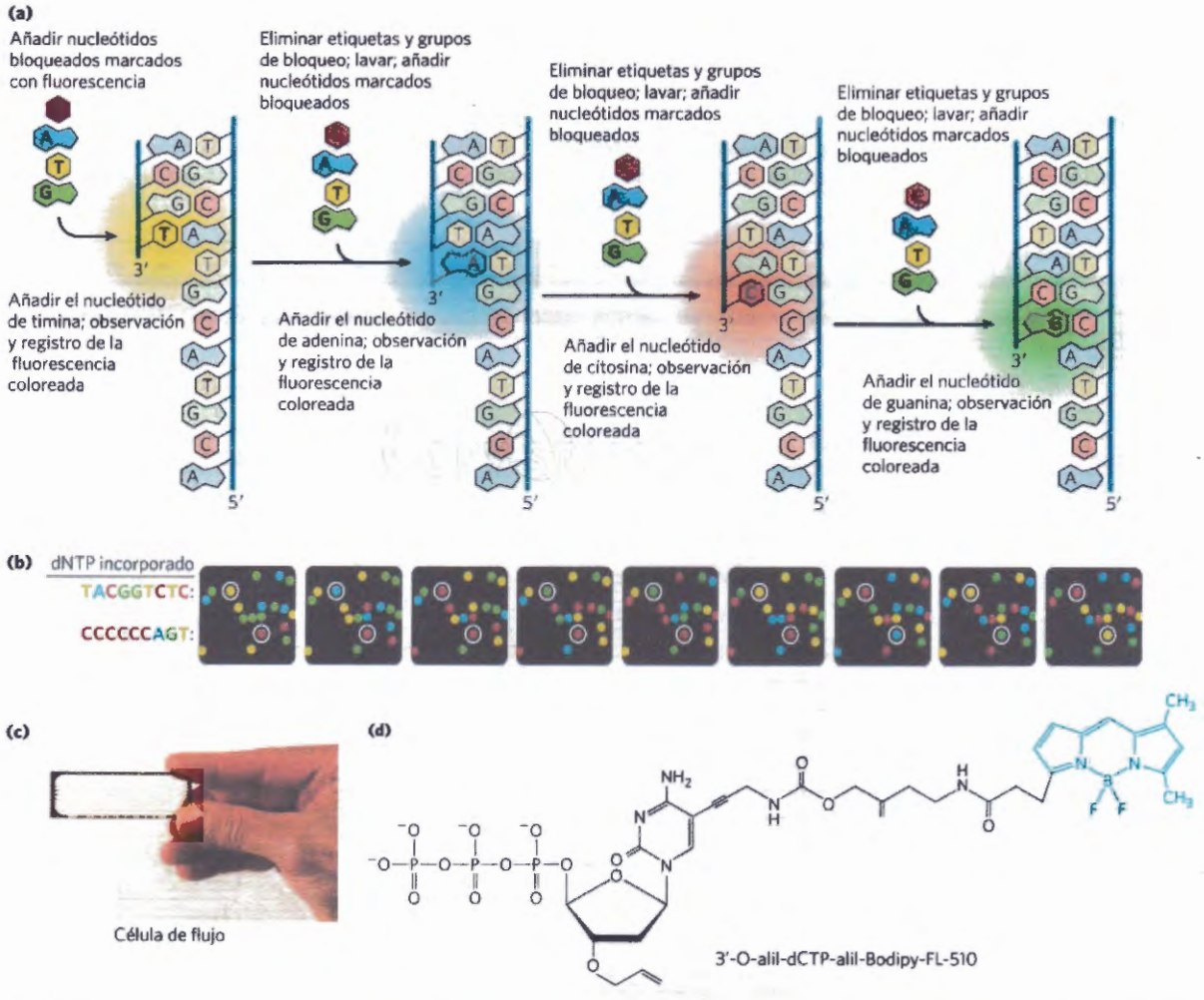


FIGURA 8-37 Secuenciación de nueva generación del terminador reversible. **(a)** El método de secuenciación del terminador reversible utiliza etiquetas fluorescentes para identificar los nucleótidos. Los grupos de bloqueo de cada nucleótido marcado con fluorescencia evitan que en cada ciclo se unan varios nucleótidos. **(b)** Seis ciclos sucesivos de una muy pequeña parte de una tanda de secuenciación con Illumina. Cada mancha coloreada representa la localización de un oligonucleótido de DNA inmovilizado sobre la superficie de la celdilla de flujo. Los acúmulos rodeados por un círculo representan la misma mancha sobre la superficie a loo largo de sucesivos ciclos y dan las secuencias indicadas. Los datos se registran automáticamente y analizados digitalmente. **(c)** Típica celdilla de flujo utilizada por el secuenciador de nueva generación. Se pueden secuenciar simultáneamente millones de fragmentos de DNA en cada uno de sus ocho canales

cebador especial de secuenciación, complementario de los oligonucleótidos de secuencia conocida de los extremos de los fragmentos de DNA de cada agrupamiento. También se añaden nucleótidos de terminación fluorescentes y DNA polimerasa. La polimerasa añade el nucleótido apropiado a las hebras de cada agrupamiento. Cada tipo de nucleótido (A, T, G o C) lleva un marcador fluorescente distinto. Estos nucleótidos de terminación llevan grupos de bloqueo unidos a los extremos 3' que permiten añadir un solo nucleótido a cada hebra. A continuación, se excitan a la vez todos los marcadores fluorescentes mediante láseres y la imagen muestra el color (y, por lo tanto, la identidad de la base) añadido a cada agrupamiento. El marcador fluorescente y los grupos de bloqueo se eliminan a continuación, química o pirolíticamente, para poder añadir el próximo nucleótido a cada agrupamiento. La secuenciación procede por etapas. Las longitudes de lectura son menores en este método, típicamente de 100 a 200 nucleótidos por agrupamiento.

Con estos métodos cada vez más potentes la determinación de la secuencia genómica completa de un organismo es más rápida y barata. La secuencia de unos pocos centenares de pares de bases puede tener poco valor a menos que sepamos su localización en el genoma. Transformar las secuencias de millones de fragmentos en una secuencia genómica requiere el alineamiento mediante el ordenador de las secuencias solapadas de los fragmentos **(Fig. 8-38)**. El número de veces que un nucleótido en particular es secuenciado como promedio se conoce como **profundidad de la secuencia** o **cubrimiento de la secuencia.** En general, un número suficientemente grande de fragmentos son secuenciados, de forma que cada nucleótido del genoma es secuenciado un promedio de 30 a 40 veces (cubrimiento 30-40x). Aunque el cubrimiento de algunos nucleótidos pueda variar (algunos serán secuenciados 100 veces, mientras que unos pocos no lo sean en absoluto), este nivel de cubrimiento garantiza que la mayor parte de los nucleótidos del genoma sean secuenciados aal menos 10 veces y que la mayoría de los errores sean detectados y eliminados. Los solapamientos hacen posible que el ordenador trace la secuencia a lo largo de un cromosoma, de un fragmento a otro. De esta forma se

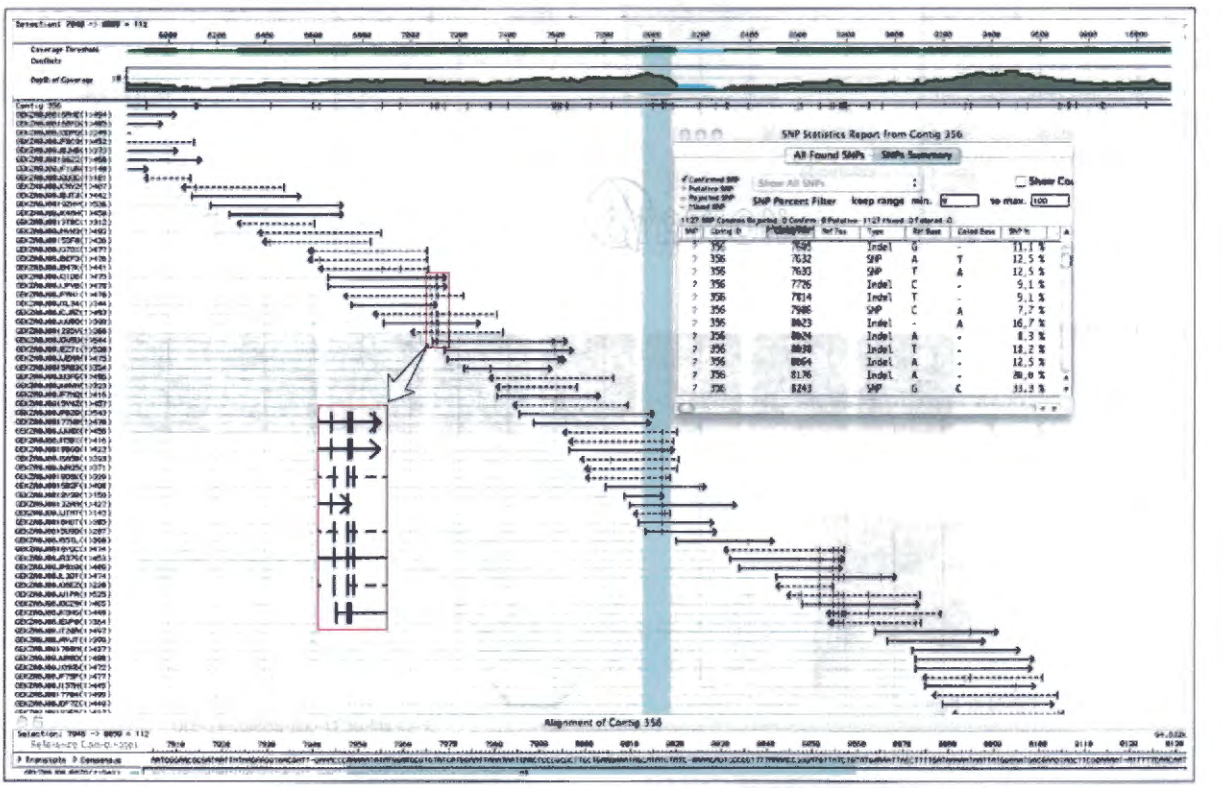


FIGURA 8-38 Ensamblaje de secuencias. En una secuencia genómica, cada par de bases del genoma esta normalmente representado en varios, a menudo docenas, fragmentos secuenciados, denominados lecturas. Se muestra una pequeña parte de la secuencia de una nueva variante de *E. coli*, con las lecturas obtenidas por un secuenciador 454. Los números de la parte superior indican las posiciones de los pares de bases del genoma, en relación a un "0" definido arbitrariamente. Todas las secuencias proceden de un cóntigo denominado 356. Las lecturas se representan por líneas horizontales, con los identificadores asignados por ordenador indicados a la izquierda. Los fragmentos de las hebras de DNA se secuencian al azar, con las secuencias obtenidas de una cadena (5'⟶ 3', de izquierda a derecha) representadas por flechas continuas y las secuencias obtenidas de la otra cadena (5'⟵3', de derecha a izquierda) representadas por líneas discontinuas. Estas últimas secuencias se muestran automáticamente como sus complementarias cuando se solapan con el conjunto global de datos. El umbral de cobertura en la parte superior es una medida de la calidad de la secuencia. La barra verde más ancha indica las secuencias que se han obtenido suficientes veces para que los resultados sean confiables El grosor de la línea de cobertura indica cuantas veces un determinado par de bases aparece en una lectura. La línea azul vertical indica una parte de la secuencia que se muestra en la parte inferior de la figura. El informe estadístico de SNP (recuadro) es un listado de las posiciones en que aparecen los polimorfismos de un único nucleótido, presentes en algunas lecturas. Estos putativos SNP a menudo se confirman por secuenciación adicional. Se indican en las lecturas mediante delgadas líneas verticales de color azul dentro de las líneas de cada lectura.

pueden unir largas secuencias contiguas denominadas **cóntigos**. En los casos de secuenciación genómica favorables, muchos cóntigos pueden abarcar millones de pares de bases. Se necesitan estrategias especiales para rellenar los inevitables huecos y para manejar las secuencias repetitivas.

En algunas aplicaciones, la profundidad de secuenciación puede aumentar 100 o incluso 1000 veces secuenciando cantidades mucho mayores de DNA genómico. Este procedimiento, en ocasiones denominado **secuenciación profunda**, puede ayudar en la determinación de una mutación u otra modificación genética en una parte de las células de un organismo. La secuenciación profunda también es útil para caracterizar secuencias genómicas en tumores cancerosos que poseen genomas inestables con frecuentes alteraciones a lo largo del crecimiento del tumor.

Las tecnologías para la secuenciación del DNA continúan avanzando con rapidez. Nuevos métodos complementan los dos ya descritos y, llegado el caso, pueden incluso sustituirlos en muchas aplicaciones. Por ejemplo, un método denominado **secuenciación mediante detección de iones con semiconductores** (fundamento del método de nombre comercial Ion Torrent), utiliza fragmentos de DNA inmovilizados del mismo modo que la secuenciación 454 e illumina. Los cuatro dNTP se introducen uno tras otro en un ciclo repetitivo, cuidando de eliminar cada uno de ellos antes de añadir el siguiente. La adición de un dNTP en un lugar determinado de la cadena en curso de crecimiento se detecta midiendo los protones liberados en la reacción. La invención de métodos de detección de luz muy sensibles ha hecho posible otro método denominado **secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (SMRT).** Se inmoviliza una sola molécula de DNA polimerasa en la base de cada uno de los millones de poros realizados con precisión de la célula de flujo. La polimerasa captura segmentos genómicos fragmentados a medida que estos difunden en el interior del poro. A continuación los dNTP difunden y cada nucleótido añadido libera su grupo fluorescente coloreado al unirse a la cadena de DNA. Un novedoso sistema de detección de luz registra el destello de luz resultante en la base del poro, el color del cual revela la identidad de cada nucleótido añadido. Este método es muy preciso y puede generar lecturas especialmente largas, de cerca de 10.000 pares de bases.

RESUMEN 8.3 Química de los ácidos nucleicos

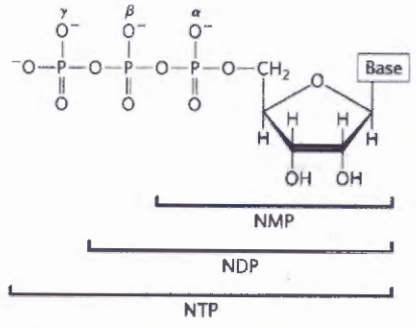
- El DNA nativo se desenrolla y sus hebras se separan reversiblemente (fusión) por efecto del calor o los pH extremos. Los DNA ricos en pares G≡C tienen temperaturas de fusión superiores a las del DNA rico en pares A=T.
- El DNA es un polímero relativamente estable. Reacciones espontáneas, tales como la desaminación de ciertas bases, la hidrólisis de los enlaces base-azúcar *N*-glucosídicos, la formación de dímeros de pirimidina inducida por radiación y el daño oxidativo, ocurren muy lentamente; sin embargo, son importantes por la baja tolerancia de las células a los cambios en el material genético.
- Es posible sintetizar oligonucleótidos de secuencia conocida con rapidez y precisión.
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar segmentos de DNA de forma sencilla y precisa si se conoce la secuencia de los extremos del fragmento de DNA amplificado.
- La secuenciación rutinaria de genes o segmentos cortos de DNA se realiza con una versión automatizada del método de los dideoxi de Sanger.
- Secuencias de DNA, incluso genomas enteros, pueden obtenerse en horas o en pocos días mediante diversos métodos, incluida la secuenciación de nueva generación.

8.4 Otras funciones de los nucleótidos

Además de las funciones que les corresponden como subunidades de los ácidos nucleicos, los nucleótidos también desempeñan otras funciones en la célula: actúan como transportadores de energía, componentes de cofactores enzimáticos y mensajeros químicos.

Los nucleótidos transportan energía química en las células

El grupo fosfato unido covalentemente al grupo hidroxilo en 5' de un ribonucleótido puede tener uno o dos fosfato adicionales incorporados. Se los conoce como nucleósidos mono-, di- y trifosfato, respectivamente **(Fig. 8-39)**. Partiendo de la ribosa, los grupos fosfato se suelen denominar α, β y γ. La hidrólisis de los nucleósidos trifosfato suministra la energía química para impulsar una amplia variedad de reacciones celulares. La adenosina 5'-trifosfato, ATP, es, con diferencia, el más ampliamente utilizado para este propósito, pero el



Abreviaturas de los ribonucleósidos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	AMP	ADP	ATP
Guanina	GMP	GDP	GTP
Citosina	CMP	CDP	CTP
Uracilo	UMP	UDP	UTP

Abreviaturas de los desoxirribonucleósidos 5'-fosfato			
Base	Mono-	Di-	Tri-
Adenina	dAMP	dADP	dATP
Guanina	dGMP	dGDP	dGTP
Citosina	dCMP	dCDP	dCTP
Timina	dTMP	dTDP	dTTP

FIGURA 8-39 Nucleósidos fosfato. Estructura general de los nucleósidos 5'-mono, di- y trifosfato (NMP, NDP y NTP) y sus abreviaturas estándar. En los desoxirribonucleósidos fosfato (dNMP, dNDP y dNTP), la pentosa es 2'-desoxi-D-ribosa.

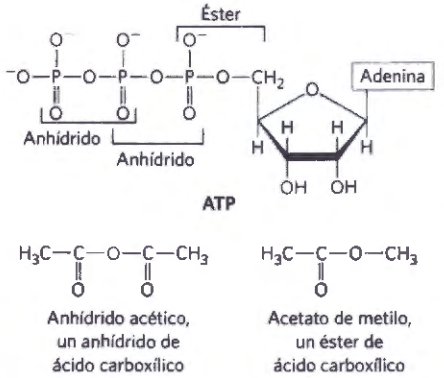


FIGURA 8-40 Los enlaces éster fosfato y anhídrido de ácido fosfórico del ATP. La hidrólisis de un enlace anhídrido libera más energía que la hidrólisis de un éster. Como comparación, se muestran un anhídrido y un éster de un ácido carboxílico.

UTP, el GTP y el CTP también se emplean en algunas reacciones. Los nucleósidos trifosfato también actúan como precursores activados en la síntesis de DNA y RNA, tal como se describe en los Capítulos 25 y 26.

La hidrólisis del ATP y otros nucleósidos trifosfato libera energía como consecuencia de la estructura del grupo trifosfato. El enlace entre la ribosa y el fosfato α es de tipo éster. Los enlaces α, β y β, γ son anhídridos de ácido fosfórico **(Fig. 8-40)**. La hidrólisis del enlace éster libera aproximadamente 14 kJ/mol en condiciones estándar, mientras que la de cada uno de los enlaces anhídrido libera aproximadamente 30 kJ/mol. La hidrólisis del ATP a menudo juega un importante papel termodinámico en las biosíntesis. Cuando está acoplada con una reacción que presenta una variación de energía libre positiva, la hidrólisis del ATP desplaza el equilibrio del proceso global en favor de la formación de producto (recuérdese la relación entre la constante de equilibrio y la variación de energía libre descrita por la Ecuación 6-3 en la p. 192).

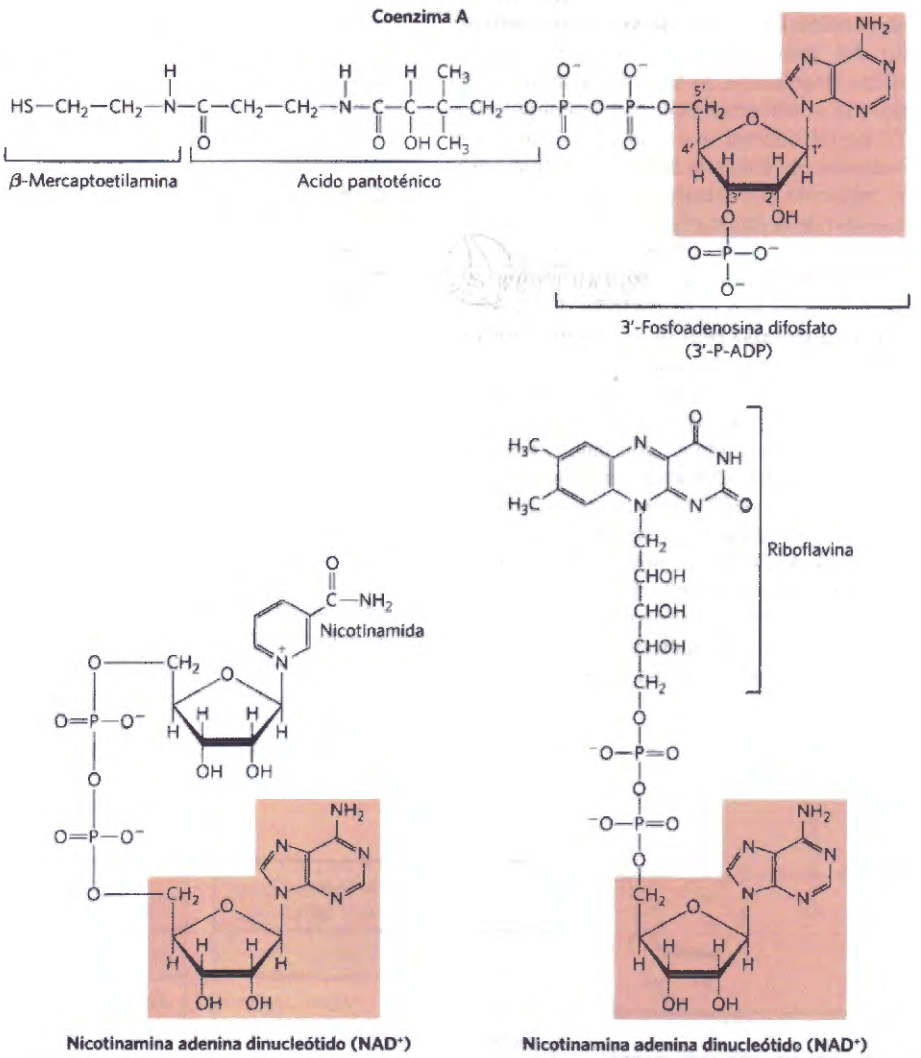


FIGURA 8-41 Algunos coenzimas que contienen adenosina. La porción de adenosina está sombreada en rosa. El coenzima A (CoA) actúa en reacciones de transferencia del grupo acilo; el grupo acilo (tal como los grupos acetilo y acetoacetilo) está unido al CoA a través de un enlace tioéster en la porción β-mercaptoetilamina. El NAD^+ participa en las transferencias de hidruro, y el FAD, la forma activa de la vitamina B_2 (riboflavina), en transferencias de electrones. Otro coenzima que incorpora adenosina en su estructura es la 5'-desoxiadenosil-cobalamina, la forma activa de la vitamina B_{12} (véase el Recuadro 17-2), que participa en las transferencias intramoleculares de grupos entre carbonos adyacentes.

Los nucleótidos de adenina forman parte de muchos cofactores enzimáticos

Un buen número de cofactores enzimáticos que llevan a cabo una amplia gama de funciones químicas contienen adenosina como parte de su estructura **(Fig. 8-41)**. No tienen ninguna relación estructural entre ellos, aparte de la presencia de adenosina. En ninguno de estos cofactores la porción de adenosina de la molécula participa directamente en su función primaria, pero si se elimina la adenosina de sus estructuras el resultado suele ser una drástica reducción de su actividad. Por ejemplo, la eliminación del nucleótido de adenina (3'-fosfoadenosina difosfato) del acetoacetil-CoA, el derivado coenzima A del acetoacetato, reduce su reactividad como sustrato de la β-cetoacil-CoA transferasa (un enzima del metabolismo lipídico) en un factor de 10^6. Aunque el papel de la adenosina no se ha estudiado en detalle, con seguridad tiene relación con la energía de unión entre el enzima y el sustrato (o cofactor) que interviene tanto en la catálisis como en la estabilización del complejo enzima-sustrato inicial (Capítulo 6). En el caso de la β-cetoacil-CoA transferasa, el nucleótido parece actuar como un "asidero" de fijación que ayuda a tirar del sustrato (acetoacetil-CoA) para colocarlo en el interior del centro activo. Es posible describir funciones parecidas para las porciones nucleosídicas de otros cofactores nucleotídicos.

¿Por qué se usa adenosina en estas estructuras en lugar de otra molécula de gran tamaño? La respuesta puede estar relacionada con cuestiones de economía evolutiva. Ciertamente, la adenosina no es la única molécula que puede aportar una cantidad suficiente de energía potencial de unión. Es posible que la importancia de la adenosina radique, no tanto en alguna característica química concreta, como en la ventaja evolutiva de usar el mismo compuesto para múltiples funciones. Una vez el ATP se convirtió en la fuente universal de energía química, los sistemas evolucionaron para sintetizar ATP con mayor abundancia que otros nucleótidos. Puesto que el ATP es abundante, resulta lógica su elección como parte de una amplia variedad de estructuras. La ganancia se hace extensiva a la estructura proteica. Un dominio proteico único capaz de fijar adenosina puede utilizarse en diferentes enzimas. Este dominio, denominado **plegamiento de unión de nucleótidos**, se encuentra en muchos enzimas que unen ATP y cofactores nucleotídicos.

Algunos nucleótidos son moléculas reguladoras

Las células responden a su entorno exterior captando señales hormonales y de otro tipo. La interacción de estas señales químicas extracelulares ("primeros mensajeros") con receptores de la superficie celular suele promover la producción de **segundos mensajeros** en el interior de la célula, que, a su vez, provocan cambios adaptativos dentro de la célula (Capítulo 12). El segundo mensajero es, a menudo, un nucleótido **(Figura 8-42)**. Uno de los más comunes es la **adenosina 3',5'-monofosfato cíclico** (**AMP cíclico** o **cAMP**), que se forma a partir del ATP, en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, enzima asociado a la cara interna de la membrana plasmática. El AMP cíclico tiene funciones reguladoras en prácticamente todas las células que no

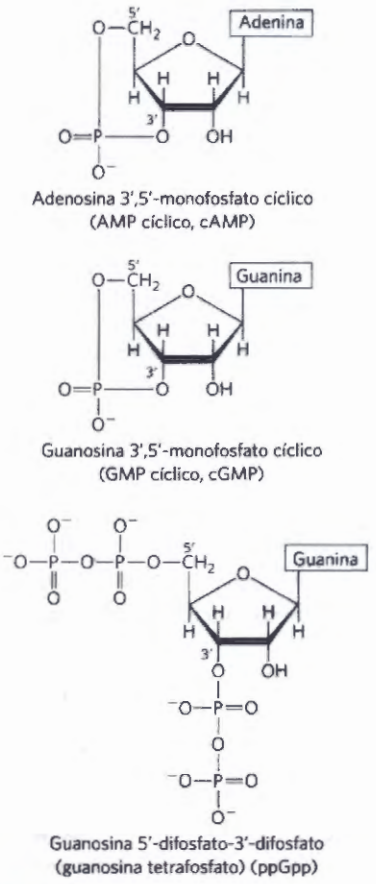


FIGURA 8-42 Tres nucleótidos reguladores.

pertenezcan al reino vegetal. El nucleótido guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) se encuentra en muchas células y tiene también funciones reguladoras.

Otro nucleótido regulador, el ppGpp (Fig. 8-42), se produce en las bacterias como respuesta a la disminución de la síntesis proteica provocada por el agotamiento de los aminoácidos del medio de cultivo. Este nucleótido inhibe la síntesis de las moléculas de rRNA y tRNA (véase la Fig. 28-22), necesarias para la síntesis proteica, evitando así la producción innecesaria de ácidos nucleicos.

Los nucleótidos de adenina también actúan de señal

El ATP y el ADP también actúan de señal en muchos organismos unicelulares y multicelulares, incluidos los humanos.

En los mamíferos, ciertas neuronas liberan ATP en las sinapsis donde se une a receptores P2x de la célula postsináptica, lo cual provoca cambios en el potencial de membrana o la liberación de un segundo mensajero intracelular que inicia diversos procesos fisiológicos, tales como el gusto, la inflamación y la contracción del músculo liso. Una importante clase de receptores de ATP, que está involucrada en la sensación de dolor, es un objeto obvio de estudio farmacológico. El ADP extracelular es una molécula de señalización que actúa a través de receptores P2x en células sensibles. El fármaco copridogrel (Plavix) inhibe la unión del ADP a los receptores P2x de las plaquetas, impidiendo la coagula-

ción de la sangre en pacientes con enfermedad cardíaca. Las rutas de señalización se tratan con más detalle en el Capítulo 12: ■

RESUMEN 8.4 Otras funciones de los nucleótidos

■ El ATP es el transportador central de energía química en las células. La presencia de la porción adenosina en una variedad de cofactores enzimáticos puede estar relacionada con los requerimientos de la energía de interacción.
■ El AMP cíclico, formado a partir de ATP en una reacción catalizada por la adenilil ciclasa, es un segundo mensajero común producido en respuesta a hormonas u otras señales químicas.
■ El ATP y el ADP actúan como neurotransmisores en numerosas vías de transducción de señales.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

Acido desoxirribonucleico (DNA) 281
Acido ribonucleico (RNA) 281
Gen 281
RNA ribosómico (rRNA) 281
RNA mensajero (mRNA) 281
RNA de transferencia (tRNA) 281
Nucleótido 281
Nucleósido 281
Pirimidina 281
Purina 281
Desoxirribonucleótidos 283
Ribonucleótido 283
enlace fosfodiéster 284
extremo 5' 285
extremo 3' 285
oligonucleótido 286
polinucleótido 286
par de bases 286
surco mayor 288
surco menor 288
forma B del DNA 290
forma A del DNA 290
forma Z del DNA 290
palíndromo 291
horquilla 292
cruciforme 292
DNA tríplex 292
tetráplex de G 293
transcripción 293
mRNA monocistrónico 293
mRNA policistrónico 293
mutación 298
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 301
DNA polimerasas 301
Técnicas para la secuenciación del DNA 305
pirosecuenciación 308
secuenciación por terminador reversible 309
profundidad de secuenciación cóntigo 311
secuenciación por detección de iones con semiconductores 311
secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (SMRT) 311
segundo mensajero 313
adenosina 3',5' -monofosfato cíclico (AMP cíclico, cAMP) 313

Problemas

1. Estructura de nucleótidos ¿Cuáles son las posiciones en un anillo de purina de un nucloeótido purínico en el DNA que poseen el potencial para formar enlaces de hidrógeno, pero no están implicados en los pares de bases de Watson y Crick?

2. Secuencia de bases de hebras de DNA complementarias Una hebra de un DNA en doble hélice tiene la secuencia (5')GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3'). Escriba la secuencia de bases de la hebra complementaria. ¿Qué tipo especial de secuencia contiene este fragmento de DNA? ¿Puede el DNA de doble cadena formar estructuras alternativas?

3. El DNA del cuerpo humano Calcular el peso, expresado en gramos, de una molécula de DNA de doble hebra que se extendiera de la tierra a la luna (~320.000 km). La doble hélice de DNA pesa aproximadamente 1×10^{-18} g por cada 1.000 pares de nucleótidos; cada par de bases tiene un espesor de 3,4 Å. Para establecer una comparación interesante, ¡piense que el cuerpo humano contiene aproximadamente 0,5 g de DNA!

4. Curvatura del DNA Suponga que un fragmento de poli(A) de cinco pares de bases produce una curvatura en una hebra del DNA de aproximadamente 20°. Calcule la curvatura total (neta) producida en el DNA si los pares de bases del centro (el tercero de cinco) de dos fragmentos sucesivos de $(dA)_6$ se sitúan a (a) 10 pares de bases o (b) 15 pares de bases de distancia. Suponga que hay 10 pares de bases por vuelta en la doble hélice del DNA.

5. Diferencias entre la estructura del DNA y la del RNA Las secuencias palindrómicas de RNA o DNA de cadena simple pueden formar estructuras en horquilla. ¿En qué se diferencian las estructuras helicoidales de una horquilla larga y completamente apareada (excepto en el extremo) de RNA y otra horquilla similar de DNA?

6. Química de los nucleótidos En las células de muchos organismos eucarióticos existen sistemas altamente especializados para reparar específicamente los errores de apareamiento G-T en el DNA. El error de apareamiento se repara creando un nuevo par de bases G≡C (no A=T). Este mecanismo de reparación del apareamiento erróneo G-T actúa al mismo tiempo que un sistema más general que repara prácticamente todos los errores de apareamiento. Proponga una explicación de por qué las células necesitan un sistema especializado para reparar los errores de apareamiento G-T.

7. Desnaturalización de los ácidos nucleicos Un oligonucleótido de DNA de cadena doble, una de cuyas cadenas tiene la secuencia TAATACGACTCACTATAGGG tiene una temperatura de fusión (tm) de 59° C. Si se sintetiza un oligonucleótido dúplex idéntico de RNA (sustituyendo T por U) ¿su temperatura de fusión será mayor o menor?

8. Daño espontáneo en el DNA La hidrólisis del enlace *N*-glucosídico entre la desoxirribosa y una purina en el DNA crea un sitio AP. Un sitio AP genera una desestabilización termodinámica mayor que la provocada por cualquier par de bases desapareado. Este efecto no está completamente explicado. Examine la estructura de un sitio AP (véase la Fig. 8-29b) y describa algunas consecuencias químicas de la pérdida de una base.

9. Predicción de la estructura de un ácido nucleico a partir de su secuencia Una región de un cromosoma secuenciado tiene la secuencia (de una de las cadenas) ATTGCATCCGCGCGTGCGCGCGCGATCCCGTTACTTTCCG. ¿Qué parte de estaa secuencia es más probable que adopte la conformación Z?

10. Estructura de los ácidos nucleicos Explique por qué la absorción de la luz UV por un DNA de doble cadena aumenta (el efecto hipercrómico) cuando el DNA se desnaturaliza.

11. Determinación de la concentración de proteína en una disolución que contiene proteínas y ácidos nucleicos La concentración de proteína o de ácido nucleico en una disolución que contenga ambos componentes puede determinarse

aprovechando sus distintas propiedades de absorción de luz. Las proteínas presentan una fuerte absorción a 280 nm y los ácidos nucleicos a 260 nm. Cuando se hallan presenten en una mezcla, es posible determinar sus concentraciones respectivas midiendo la absorbancia (A) de la disolución a 280 nm y 260 nm, con ayuda de la tabla adjunta. La tabla indica el porcentaje de la masa total que corresponde al ácido nucleico en función de $R_{280/260}$, la relación de absorbancias a 280 y 260 nm. El factor, *F*, permite corregir la lectura de A_{280} para obtener una mejor estimación de la concentración de proteína. La concentración de proteína (en mg/mL) es igual a F x A_{280} (suponiendo que la cubeta tenga 1 cm de paso de luz). Calcule las concentraciones de proteína y de ácido nucleico si $A_{280} = 0,69$ y $A_{260} = 0,94$.

$R_{280/260}$	Proporción de ácido nucleico (%)	*F*
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

12. Solubilidad de los componentes del DNA Dibuje las siguientes estructuras y ordénelas según su solubilidad relativa en agua (de más soluble a menos soluble): desoxirribosa, guanina, fosfato. ¿Por qué estas solubilidades están en consonancia con la estructura tridimensional del DNA de doble cadena?

13. La reacción en cadena de la polimerasa Abajo se muestra una hebra de una secuencia de DNA cromosómico. Se pretende amplificar y aislar un fragmento de DNA definido por la secuencia en rojo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Diseñe dos cebadores para la PCR, ambos de 20 nucleótidos, que sirvan para amplificar este segmento de DNA. El producto final de la PCR generado con los cebadores no debería contener secuencias fuera del segmento en rojo.

5′ – – – AATGCCGTCAGCCGATCTGCCTCGAGTCAATCGA
TGCTGGTAACTTGGGGTATAAAGCTTACCCATGGTATCGTAG
TTAGATTGATTGTTAGGTTCTTAGGTTTAGGTTTCTGGTATT
GGTTTAGGGTCTTTGATGCTATTAATTGTTTGGTTTTGATTT
GGTCTTTATATGGTTTATGTTTTAAGCCGGGTTTTGTCTGG-
GATGGTTCGTCTGATGTGCGCGTAGCGTGCGGCG – – – 3′

14. Secuenciación genómica En los grandes proyectos de secuenciación, los datos iniciales a menudo presentan interrupciones donde no se ha obtenido información. Para llenar los huecos, los cebadores complementarios de la hebra acabada en 5′ (es decir, idéntica a la secuencia de la hebra terminada en 3′) al final de cada cóntigo resultan especialmente útiles. Explique cómo pueden usarse estos cebadores:

15. Secuenciación de nueva generación En la secuenciación de terminador reversible, cómo se vería afectado el proceso de secuenciación si el grupo de bloqueo en 3′ de cada nucleótido fuese sustituido por el 3′-H presente en los dideoxinucleótidos en la secuenciación de Sanger.

16. Fundamento de la secuenciación por el método de Sanger En el método de Sanger (didesoxi) para secuenciar DNA, se añade una pequeña cantidad de didesoxinucleótido trifosfato, supongamos ddCTP, a la reacción de secuenciación junto con una cantidad mayor del correspondiente dCTP ¿Qué resultado se observaría si se omitiera el dCTP?

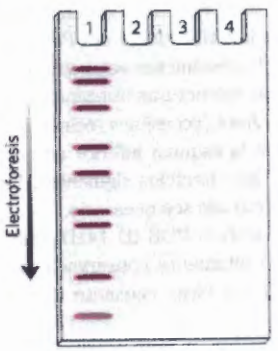
17. Secuenciación del DNA El siguiente fragmento de DNA fue secuenciado por el método de Sanger. El asterisco rojo representa un marcador fluorescente.

*5′ ——— 3′-OH
3′ ——— ATTACGCAAGGACATTAGAC---5′

Una muestra del DNA fue tratada con una DNA polimerasa y con cada una de las mezclas de nucleótidos (en un tampón apropiado) indicadas a continuación. Los didesoxinucleótidos (ddNTP) se añadieron en cantidades relativamente pequeñas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

El DNA resultante fue separado por electroforesis en gel de agarosa y las bandas fluorescentes localizadas en el gel. Se muestra el patrón de bandas obtenido con la mezcla de nucleótidos 1. ¿Suponiendo que todas las mezclas fuesen analizadas en el mismo gel, qué apariencia tendrían los restantes carriles?



18. Fosfodiesterasa de veneno de serpiente Una exonucleasa es un enzima que separa nucleótidos de forma secuencial a partir del extremo de una cadena polinucleotídica. La fosfodiesterasa de veneno de serpiente, que hidroliza nucleótidos desde el extremo 3' de cualquier oligonucleótido que tenga un grupo 3' hidroxilo libre, rompe entre el 3' hidroxilo de la ribosa o desoxirribosa y el grupo fosforilo del siguiente nucleótido. Actúa tanto sobre DNA como sobre RNA de cadena sencilla y no presenta especificidad de base. Este enzima se utilizó en la determinación de secuencias antes del desarrollo de las técnicas modernas de secuenciación de ácidos nucleicos. ¿Cuáles son los productos de la digestión parcial por la fosfodiesterasa de veneno de serpiente de un oligonucleótido con la siguiente secuencia?
(5')GCGCCAUUGC(3')-OH

19. Conservación del DNA en las endosporas bacterianas Las endosporas bacterianas se forman cuando el ambiente ya no es adecuado para el mantenimiento del metabolismo celular. La bacteria del suelo, *Bacillus subtilis*, por ejemplo, empieza el proceso de esporulación cuando se han agotado uno o más nutrientes. El producto final es una pequeña estructura metabólicamente inactiva que puede sobrevivir casi indefinidamente sin metabolismo detectable. Las esporas tienen mecanismos para impedir la acumulación de mutaciones potencialmente letales en su DNA durante períodos de latencia superiores a los 1.000 años. Las esporas de *Bacillus subtilis* son mucho más resistentes al calor, radiación UV y agentes oxidantes, todos los cuales provocan mutaciones, que las células en crecimiento.

Un factor que impide la lesión potencial del DNA en las esporas es una gran disminución de su contenido en agua. ¿De qué modo afectaría la deshidratación a algunos tipos de mutaciones?

Las endosporas contienen una clase de proteínas denominadas pequeñas proteínas ácido-solubles (SASP) que se unen a su DNA impidiendo la formación de dímeros de tipo ciclobutano. ¿Qué produce los dímeros de ciclobutano y por qué las endosporas bacterianas necesitan mecanismos para impedir su formación?

20. Síntesis de oligonucleótidos En el esquema de la Figura 8-35, se modifica cada base que tiene que añadirse al oligonucleótido en crecimiento para activar su 3' hidroxilo y se une un grupo dimetoxitritilo (DMT) al 5' hidroxilo ¿Cuál es la función del grupo DMT de la base entrante?

Bioquímica en Internet

21. La estructura del DNA El descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA ayudó a los investigadores a comprender de qué modo esta molécula transporta información que se puede transmitir fielmente de una generación a la siguiente. Para ver la estructura secundaria del DNA de doble cadena vaya al sitio Web del Protein Data Bank (www.pdb.org). Utilice los identificadores del PDB indicados más adelante para bajar los resúmenes estructurales de las dos formas de DNA. Abra las estructuras utilizando JSMol y use los controles del menú Jmol (accesibles tecleando control o sobre el logotipo Jmol en la esquina inferior derecha de la pantalla) para completar los ejercicios siguientes. Use los enlaces de ayuda de JSmol cuando sea necesario.

Obtenga el archivo PDB ID 141D, que contiene una secuencia de DNA altamente conservada del extremo del genoma del VIH-1 (el virus causante del SIDA). Muestre la molécula en forma de estructura de bolas y varillas con los diferentes elementos de distinto color. Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. Localice e identifique las bases individuales. Identifique el extremo 5' de cada cadena. Localice los surcos mayor y menor. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

Obtenga el archivo PDB ID 145D, correspondiente a un DNA en la conformación Z. Muestre la molécula en forma de estructura de bolas y varillas con los elementos coloreados. Identifique el armazón azúcar-fosfato de cada cadena del dúplex de DNA. ¿Se trata de una hélice dextrógira o levógira?

(c) Para apreciar plenamente la estructura secundaria del DNA seleccione la opción estereo del visor. En el menú de control, Seleccione *>All*, a continuación *Style >Cross-eyed viewing* o *Wall-eyed viewing*. (Si dispone de gafas estereográficas, seleccione la opción apropiada). Verá dos imágenes de la molécula de DNA. Permanezca sentado con su nariz a unos 25 cm aproximadamente de la pantalla y enfoque la vista en la punta de su nariz (*cross-eyed*) o en los bordes opuestos de la pantalla (*wall-eyed*). En el fondo debería ver tres imágenes de la hélice de DNA. Desplace el enfoque a la imagen central, que debería aparecer en forma tridimensional (Observe que sólo uno de los dos autores puede realizar esta tarea).

Problema de analisis de datos

19. Estudios de Chargaff de la estructura del DNA La sección "El DNA es una doble hélice que almacena información genética" incluye un resumen de los hallazgos principales de Erwin Chargaff y colaboradores en forma de cuatro conclusiones ("Reglas de Chargaff", p. 288). En este problema examinará los datos obtenidos por Chargaff que apoyan estas conclusiones.

En un artículo, Chargaff (1950) describió sus métodos analíticos y sus resultados iniciales. De forma sucinta, trató muestras de DNA con ácido para eliminar las bases, separó las bases por cromatografía en papel y midió la cantidad de cada base por espectroscopia de UV. Sus resultados se muestran en las tres tablas siguientes. La *relación molar* es la relación entre el número de moles de cada base en la muestra y el número de moles de fosfato en la muestra, que corresponde a la fracción del número total de bases representada por cada base en particular. La *recuperación* es la suma de las cuatro bases (la suma de las relaciones molares); la recuperación completa de todas las bases del DNA daría una recuperación de 1.0.

Relaciones molares en el DNA de buey

	Timo			Bazo		Hígado
Base	**Prep.1**	**Prep. 2**	**Prep. 3**	**Prep.1**	**Prep. 2**	
Adenina	0,28	0,28	0,30	0,25	0,26	0,26
Guanina	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21	0,20
Citosina	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17	
Timina	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	
Recuperación	*0,88*	*0,94*	*0,94*	*0,84*	*0,88*	

Relaciones molares en el DNA humano

	Esperma		Timo	Hígado	
Base	**Prep.1**	**Prep. 2**	**Prep. 1**	**Normal**	**Carcinoma**
Adenina	0,29	0,27	0,28	0,27	0,27
Guanina	0,18	0,17	0,19	0,19	0,18
Citosina	0,18	0,18	0,16		0,15
Timina	0,31	0,30	0,28		0,27
Recuperación	*0,96*	*0,92*	*0,91*		*0,87*

Relaciones molares en el DNA de microorganismos

	Levadura		Bacilos de la tuberculosis aviar
Base	**Prep.1**	**Prep. 2**	**Prep. 1**
Adenina	0,24	0,30	0,12
Guanina	0,14	0,18	0,28
Citosina	0,13	0,15	0,26
Timina	0,25	0,29	0,11
Recuperación	*0,76*	*0,92*	*0,77*

Sobre la base de estos datos, Chargaff concluyó que "hasta ahora no se han encontrado diferencias de composición en el DNA de diferentes tejidos de la misma especie". Ello está de acuerdo con la conclusión 2 de este capítulo. Sin embargo, una mirada escéptica a los datos anteriores podría llevar a afirmar, ¡A mi me parecen diferentes! Si fuese Chargaff, ¿cómo utilizaría estos datos para convencer a un escéptico de cambiar de opinión?

La composición en bases del DNA de células normales y cancerosas de hígado (hepatocarcinoma) no era significativamente distinta ¿Esperaría que la técnica de Chargaff fuese capaz de detectar diferencias entre el DNA normal y el de las células cancerosas? Explique su razonamiento.

Como puede suponer, los datos de Chargaff no eran del todo convincentes. Continuó mejorando sus técnicas, como se describe en su artículo de 1951, en el cual determinó las relaciones molares de las bases del DNA de diferentes organismos.

Origen	A:G	T:C	A:T	G:C	Purina: pirimidina
Buey	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Humanos	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Gallina	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Salmón	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Trigo	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Levadura	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
Haemophilus influenzae tipo c	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
E. coli K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Bacilo de la tubrerculosis aviar	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
Serratia marcescens	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
Bacillus schatz	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

Según Chargaff, como se afirma en la conclusión 1 de este capítulo, "La composición de bases del DNA generalmente varía de una especie a otra". Argumente, sobre la base de los datos presentados hasta ahora, a favor de esta conclusión.

De acuerdo con la conclusión 4, "En todos los DNA celulares, con independencia de la especie... A+G=T+C". Argumente, sobre la base de los datos presentados hasta ahora, a favor de esta conclusión.

Chargaff pretendía descalificar la "hipótesis del *tetra*nucleótido", según la cual el DNA era un polímero del tetranucleótido $(AGCT)_n$ repetido monótonamente y por lo tanto incapaz de contener información asociada a la secuencia. Aunque los datos presentados anteriormente muestran que el DNA no puede consistir en un simple tetranucleótido, si así fuese todas las muestras tendrían relaciones molares de 0,25 para cada base, todavía era posible que el DNA de diferentes organismos fuese ligeramente más complejo, pero basado en la repetición monótona de una secuencia.

Para abordar este problema, Chargaff tomó DNA de germen de trigo y lo trató con desoxirribonucleasa durante diferentes intervalos de tiempo. A cada intervalo de tiempo, parte del DNA se convertía en fragmentos más pequeños; a los fragmentos más largos que quedaban sin digerir los denomino el "núcleo". En la tabla que sigue, el "núcleo 19%" corresponde a los fragmentos mayores restantes una vez se ha degradado el 81% del DNA; el "núcleo 8%" corresponde a los fragmentos mayores después de la degradación del 92% del DNA.

Base	DNA intacto	Núcleo 19%	Núcleo 8%
Adenina	0,27	0,33	0,35
Guanina	0,22	0,20	0,20
Citosina	0,22	0,16	0,14
Timina	0,27	0,26	0,23
Recuperación	*0,98*	*0,95*	*0,92*

(e)¿Cómo utilizaría estos datos para argumentar que el DNA de germen de trigo no está formado por una secuencia repetida monótonamente?

Referencias

Chargaff, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6:201–209.

Chargaff, E. 1951. Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* 10:654–659.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 9

Tecnologías de la información basadas en el DNA

Los medios para el autoaprendizaje que le ayudarán a practicar lo que ha aprendido y a consolidar los conceptos de este Capítulo se encuentran en www.macmillan.learling.com/LehningerBiochemistry7e.

9.1 Estudio de los genes y sus productos 320

9.2 Métodos basados en el DNA para estudiar la función de las proteínas 334

9.3 La genómica y la historia humana 343

La complejidad de las moléculas y sistemas descritos en este libro puede a veces ocultar una realidad bioquímica: lo que hemos aprendido hasta ahora no es más que un principio. Cada día se descubren nuevas proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos, cuyas funciones con frecuencia se desconocen ¿Cuántos quedan por descubrir y cuál es su función? Incluso biomoléculas bien caracterizadas continúan desafiando a los investigadores con un sinnúmero de mecanismos no resueltos y preguntas funcionales. Una nueva era, definida por las tecnologías que hacen posible el acceso a la totalidad del DNA celular, "el genoma", ha acelerado el proceso.

La palabra genoma, acuñada por el botánico alemán Hans Winkler en 1920 deriva simplemente de combinar *gen* y la sílaba final de *cromosoma*. **Genoma** se define actualmente como el complemento genético haploide completo de un organismo En esencia, un genoma es una copia de la información hereditaria requerida para especificar un organismo. En los organismos que se reproducen sexualmente, el genoma incluye

Los millares de secuencias genómicas completas disponibles dan una idea de la dificultad de la tarea pendiente. En pocas palabras, desconocemos la función de la mayor parte del DNA, que a menudo incluye la mitad o más de los genes de un genoma típico. Estas mismas secuencias genómicas ofrecen una oportunidad sin precedentes. No hay otra fuente de información sobre una célula o un organismo más importante que su propio DNA. La tarea de extraer esta información ha dado lugar a sofisticadas tecnologías basadas en el DNA, que se encuentran en la base de cualquier desarrollo bioquímico. Las tecnologías que vamos ahora a examinar (junto con otras varias discutidas en el Capítulo 8) están involucradas en todos los temas que exploraremos en los siguientes capítulos.

El estudio de las moléculas de DNA presenta un problema especial: su tamaño. Los cromosomas son con mucho las biomoléculas más grandes de cualquier célula. ¿Cómo puede encontrarse la información que interesa cuando se trata de una pequeña parte de un cromosoma que puede contener millones o incluso miles de millones de pares de bases? Estos problemas empezaron a resolverse en la década de 1970.

Décadas de esfuerzos de miles de científicos, trabajando en genética, bioquímica, biología celular y química física, se materializaron finalmente en los laboratorios de Paul Berg, Herbert Boyer y Stanley Cohen, que idearon técnicas para la localización, el aislamiento, la preparación y el estudio de pequeños segmentos de DNA procedentes de cromosomas mucho mayores. Las tecnologías avanzadas descritas en el Caítulo 8, que continuan evolucionando y mejorando, siguieron de cerca. Thomas H. Roderick de los Laboratorios Jackson en Bar Harbour, Maine, propuso el vocábulo *Genomics* para nombrar una nueva revista y éste término acabó definiendo el nuevo ámbito de conocimiento. Las técnicas para la clonación del DNA han hecho posible la **genómica** moderna y han contribuido al desarrollo de las tecnologías empleadas por la **biología de sistemas**, es decir, el estudio de la bioquímica a nivel de células y de organismos enteros.

El tratamiento de los contenidos de este capítulo puede resultar en cierta medida conflictivo para cualquier estudiante o profesor. En primer lugar, los métodos descritos fueron posibles gracias al progreso de los conocimientos sobre el metabolismo del DNA y el RNA. Por lo tanto, es necesario comprender algunos conceptos fundamentales de la replicación del DNA, la transcripción del RNA, la síntesis proteica y la regulación génica para entender el fundamento de estos métodos. Al mismo tiempo, sin embargo, la bioquímica moderna se basa en tan gran medida en estos métodos que el tratamiento de cualquier aspecto de esta disciplina

resulta muy difícil sin su adecuada descripción. La presentación de estos métodos al principio del libro equivale a reconocer que éstos se hallan íntimamente entrelazados tanto con los progresos que los originaron como con los nuevos descubrimientos que están propiciando. El contexto que nos vemos obligados a desarrollar no representa solamente una introducción a la tecnología, sino también un avance de los muchos aspectos fundamentales de la bioquímica del DNA y el RNA que se tratarán en capítulos posteriores.



Paul Berg
[Fuente: NIH National Library of Medicine.]



Herbert Boyer
[Fuente: Cortesía de Dr. Jane Gitschier.]



Stanley N. Cohen
[Fuente: NIH National Library of Medicine.]

Comenzamos este capítulo con la descripción de los principios de la clonación de DNA. A continuación ilustraremos el abanico de aplicaciones y las potencialidades de muchas de las nuevas tecnologías que sostienen y aceleran el avance de la bioquímica.

9.1 Estudio de los genes y sus productos

Un investigador ha aislado un nuevo enzima que sabe que es la clave de una enfermedad humana. Confía en aislar una gran cantidad de proteína para estudiarla y cristalizarla para estudios estructurales. Pretende alterar los aminoácidos del sitio activo para entender la reacción por ella catalizada. Planea un programa de investigación para determinar cómo este enzima interacciona y es regulado por otras proteínas en la célula. Todo ello y mucho más es posible si logra obtener el gen que codifica el enzima. Desgraciadamente, ese gen consiste en unos pocos miles de pares de bases de un cromosoma humano cuyo tamaño se mide en centenares de millones de pares de bases. ¿Cómo puede aislar el pequeño fragmento que necesita y después estudiarlo? La respuesta hay que buscarla en la clonación de DNA y en los métodos desarrollados para manipular los genes clonados.

Los genes pueden aislarse por clonación de DNA

Un *clon* es una copia idéntica. Este término originalmente se aplicó al aislamiento y reproducción de una célula para crear una población de células idénticas. Aplicado al DNA, un clon consiste en muchas copias idénticas de un determinado segmento génico. En resumen, nuestro investigador debe cortar el gen, extraerlo del cromosoma mucho mayor, unirlo a un fragmento mucho menor de DNA transportador y hacer que un microorganismo fabrique muchas copias. En esto consiste la **clonación del DNA**. El resultado es la amplificación selectiva de un gen o de un segmento de DNA en particular, que facilita su aislamiento y estudio. Generalmente, la clonación de DNA perteneciente a cualquier organismo consta de cinco etapas principales:

1. *Obtención del segmento de DNA para la clonación.* Las endonucleasas específicas de secuencia (endonucleasas de restricción) hacen las veces de tijeras moleculares, que reconocen secuencias específicas del DNA y lo cortan en fragmentos menores adecuados para el clonaje. Alternativamente, el DNA puede ser fragmentado al azar hasta obtener el tamaño deseado. Puesto que la secuencia de las zonas interesantes a menudo es conocida (disponible en los bancos de datos), algunos fragmentos de DNA que hay que clonar se amplifican con la reacción en cadena de la polimerasa o simplemente se sintetizan (ambos métodos se describen en el Capítulo 8).
2. *Selección de una pequeña molécula de DNA capaz de replicación autónoma.* Estos pequeños DNA se denominan **vectores de clonación** (un vector es un agente de entrega). Normalmente se trata de plásmidos o de DNA víricos.
3. *Unión covalente de dos fragmentos de DNA.* El enzima DNA ligasa une el vector de clonación y el DNA que se desea clonar. Las moléculas de DNA compuestas de segmentos unidos covalentemente, procedentes de dos o más fuentes se denominan **DNA recombinantes.**
4. *Traslado del DNA del tubo de ensayo a una célula huésped,* que proporcionará la maquinaria enzimática necesaria para la replicación del DNA.
5. *Selección o identificación de las células huésped que contienen DNA recombinante.* El vector de clonación normalmente posee características que permiten que la célula huésped sobreviva en un medio donde las células carentes del vector morirían. Las células que contienen el vector son, pues, "seleccionables" en este medio.

Los métodos utilizados para llevar a cabo estas tareas, y otras relacionadas, se denominan colectivamente **tecnología del DNA recombinante** o, de manera más informal, **ingeniería genética**.

En esta discusión inicial, nos centraremos en la clonación de DNA en la bacteria *Escherichia coli*, que fue el primer organismo utilizado en el trabajo con DNA recombinante, y que todavía es la célula huésped más común. *E. coli* tiene muchas ventajas: se conoce bastante bien el metabolismo de su DNA (y muchos otros de sus procesos bioquímicos); muchos vectores de clonación que se encuentran asociados de manera natural con *E. coli*, tales como plásmidos y bacteriófagos (virus bacterianos, también denominados fagos), están bien caracterizados, y se dispone de técnicas efectivas para

TABLA 9-1 Algunos enzimas utilizados en la tecnología del DNA recombinante

Enzima(s)	Función
Endonucleasas de restricción de tipo II	Corta el DNA en secuencias específicas de base
DNA ligasa	Une dos moléculas o fragmentos de DNA
DNA polimerasa I (*E. coli*)	Rellena los huecos en el DNA dúplex por adición secuencial de nucleótidos en los extremos 3'
Transcriptasa inversa	Hace una copia de DNA a partir de una molécula de RNA
Polinucleótido quinasa	Añade un grupo fosfato al grupo OH del extremo 5' de un polinucleótido para marcarlo o para permitir su ligación
Transferasa terminal	Añade colas homopoliméricas al grupo –OH del extremo 3' de un dúplex lineal
Exonucleasa III	Elimina nucleótidos de los extremos 3' de una hebra de DNA
Exonucleasa del bacteriófago λ	Elimina nucleótidos de los extremos 5' de un dúplex para exponer los extremos 3' monohebra
Fosfatasa alcalina	Elimina fosfatos terminales tanto del extremo 5' como del 3' (o de ambos)

la transferencia de DNA de una bacteria a otra. Los principios aquí discutidos son básicamente aplicables a la clonación en otros organismos, tema que trataremos con mayor profundidad más adelante.

El DNA recombinante se obtiene mediante endonucleasas de restricción y DNA ligasa

Un conjunto de enzimas, disponibles gracias a décadas de investigación del metabolismo de los ácidos nucleicos, es de particular importancia para la tecnología del DNA recombinante (Tabla 9-1). En la base de la metodología general para producir y propagar una molécula de DNA recombinante se encuentran dos tipos de enzimas **(Fig. 9-1)**. Primero, las **endonucleasas de restricción** (también denominadas enzimas de restricción) reconocen y cortan el DNA en secuencias específicas (secuencias de reconocimiento o sitios de restricción), con lo que generan una serie de fragmentos más pequeños. Segundo, el fragmento de DNA que hay que clonar puede unirse a un vector de clonación adecuado mediante **DNA ligasas,** que empalman las moléculas de DNA. El vector recombinante se introduce entonces en una célula huésped, que amplifica el fragmento a lo largo de muchas divisiones celulares.

Las endonucleasas de restricción se encuentran en muchas especies bacterianas. Werner Arber descubrió, a principios de la década de 1960, que su función biológica consiste en reconocer y cortar DNA foráneo (p.ej., el DNA de un virus infeccioso); se dice que este DNA está *restringido*. En el DNA de la célula huésped, la secuencia reconocida por su endonucleasa de restric-

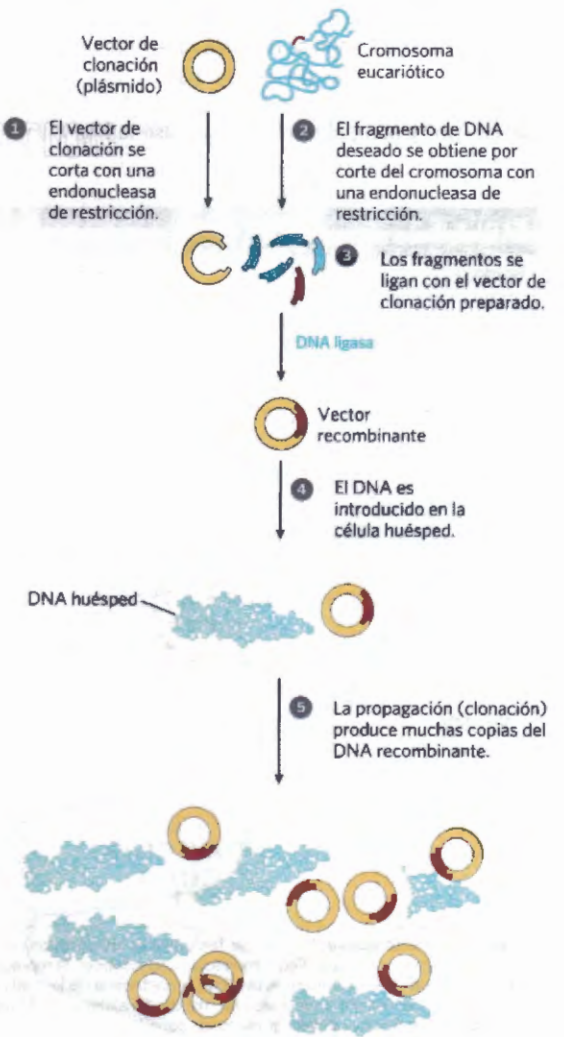


FIGURA 9-1 Representación esquemática de la clonación de DNA. Un vector de clonación y los cromosomas eucarióticos se cortan por separado con la misma endonucleasa de restricción (por simplicidad se muestra un solo cromosoma). Los fragmentos que se han de clonar se ligan a continuación con el vector de clonación. El DNA recombinante resultante (se muestra un solo vector recombinante) se introduce en una célula huésped para ser propagado (clonado). Observe que esta ilustración no es a escala: el tamaño del cromosoma de *E. coli* en relación al de un vector de clonación típico (tal como un plásmido) es mucho mayor que el aquí mostrado.

ción está protegida de la digestión por metilación del DNA, catalizada por una DNA metilasa específica. La endonucleasa de restricción y la metilasa correspondiente constituyen un **sistema de modificación-restricción**.

Hay tres tipos de endonucleasas de restricción, designados como I, II, y III. Los tipos I y III son grandes complejos formados por múltiples subunidades que contienen, simultáneamente, las actividades endonucleasa y metilasa. Las endonucleasas de restricción de tipo I cortan el DNA al azar, en lugares que pueden encontrarse a 1.000 pares de bases o más de la secuencia de reconocimiento. Las endonucleasas de restricción de tipo III cortan el DNA a unos 25 pares de bases de la secuencia de reconocimiento. Ambos tipos de enzimas se mueven a lo largo del DNA mediante un mecanismo que necesita la energía del ATP. **Las endonucleasas de restricción de tipo II**, aisladas por primera vez por Hamilton Smith en 1970, son más sencillas, no necesitan ATP y catalizan la rotura hidrolítica de enlaces fosofidéster concretos en el DNA dentro de la misma secuencia de reconocimiento. La extraordinaria utilidad de este grupo de endonucleasas de restricción fue puesta de manifiesto por Daniel Nathans, que los usó por primera vez para desarrollar nuevos métodos para cartografiar y analizar genes y genomas.

Se han descubierto millares de endonucleasas de restricción de tipo II en diferentes especies bacterianas y más de 100 secuencias de DNA diferentes son reconocidas por uno o más de estos enzimas. Las secuencias reconocidas tienen normalmente de 4 a 6 pares de bases (pb) y son palindrómicas (véase la Fig. 8-18). En la Tabla 9-2 se muestran unas pocas secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción de tipo II.

Algunas endonucleasas de restricción realizan cortes indentados en las dos hebras del DNA, que dejan de dos a cuatro nucleótidos desapareados en cada extremo resultante. Se los conoce como **extremos cohesivos (Fig. 9-2a)**, debido a que pueden aparearse entre sí o con extremos cohesivos complementarios de otros fragmentos de DNA. Otras endonucleasas de restricción cortan ambas cadenas del DNA en los enlaces fosfodiéster opuestos, de modo que no dejan bases desapareadas en los extremos; comúnmente se denominan **extremos romos** (Fig. 9-2b).

El tamaño medio de los fragmentos producidos al cortar DNA genómico con una endonucleasa de restricción depende de la frecuencia con que se encuentre un sitio de restricción específico en la molécula de DNA, que, a su vez, depende en buena medida del tamaño de la secuencia de reconocimiento.

En una molécula de DNA de secuencia al azar, en la que los cuatro nucleótidos fuesen igualmente abundantes, una secuencia de 6 pares de bases reconocida por una endonucleasa de restricción tal como *Bam*HI se encontraría como promedio una vez cada 4^6 (4.096) pb. Los enzimas que reconocen una secuencia de 4 pb producirían fragmentos de DNA más pequeños en una molécula de DNA de secuencia al azar; una secuencia de reconocimiento de este tamaño debería encontrarse, como promedio, una vez cada 4^4 (256) pb. En las moléculas naturales de DNA, las secuencias de reconocimiento suelen ocurrir con menor frecuencia de lo espe-

TABLA 9-2 Secuencias de reconocimiento para algunas endonucleasas de restricción de tipo II

Enzima(s)	Función	Enzima(s)	Función
BamHI	(5′) G G A T C C (3′) C C T A G G	HindIII	(5′) A A G C T T (3′) T T C G A A
ClaI	(5′) A T C G A T (3′) T A G C T A	NotI	(5′) G C G G C C G C (3′) C G C C G G C G
EcoRI	(5′) G A A T T C (3′) C T T A A G	PstI	(5′) C T G C A G (3′) G A C G T C
EcoRV	(5′) G A T A T C (3′) C T A T A G	PvuII	(5′) C A G C T G (3′) G T C G A C
HaeIII	(5′) G G C C (3′) C C G G	Tth111I	(5′) G A C N N N G T C (3′) C T G N N N C A G

Nota: Las flechas indican los enlaces fosfodiéster hidrolizados por cada endonucleasa de restricción. Los asteriscos indican las bases que son metiladas por la correspondiente metilasa (si se conoce). N representa cualquier base. El nombre de los enzimas consiste en una abreviatura de tres letras (en cursiva) del nombre de la especie bacteriana de la cual procede, seguida a veces por una indicación de la cepa y números romanos para distinguir diferentes endonucleasas de restricción aisladas de la misma especie bacteriana. Así, *Bam*HI es la primera (I) endonucleasa de restricción procedente de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H.

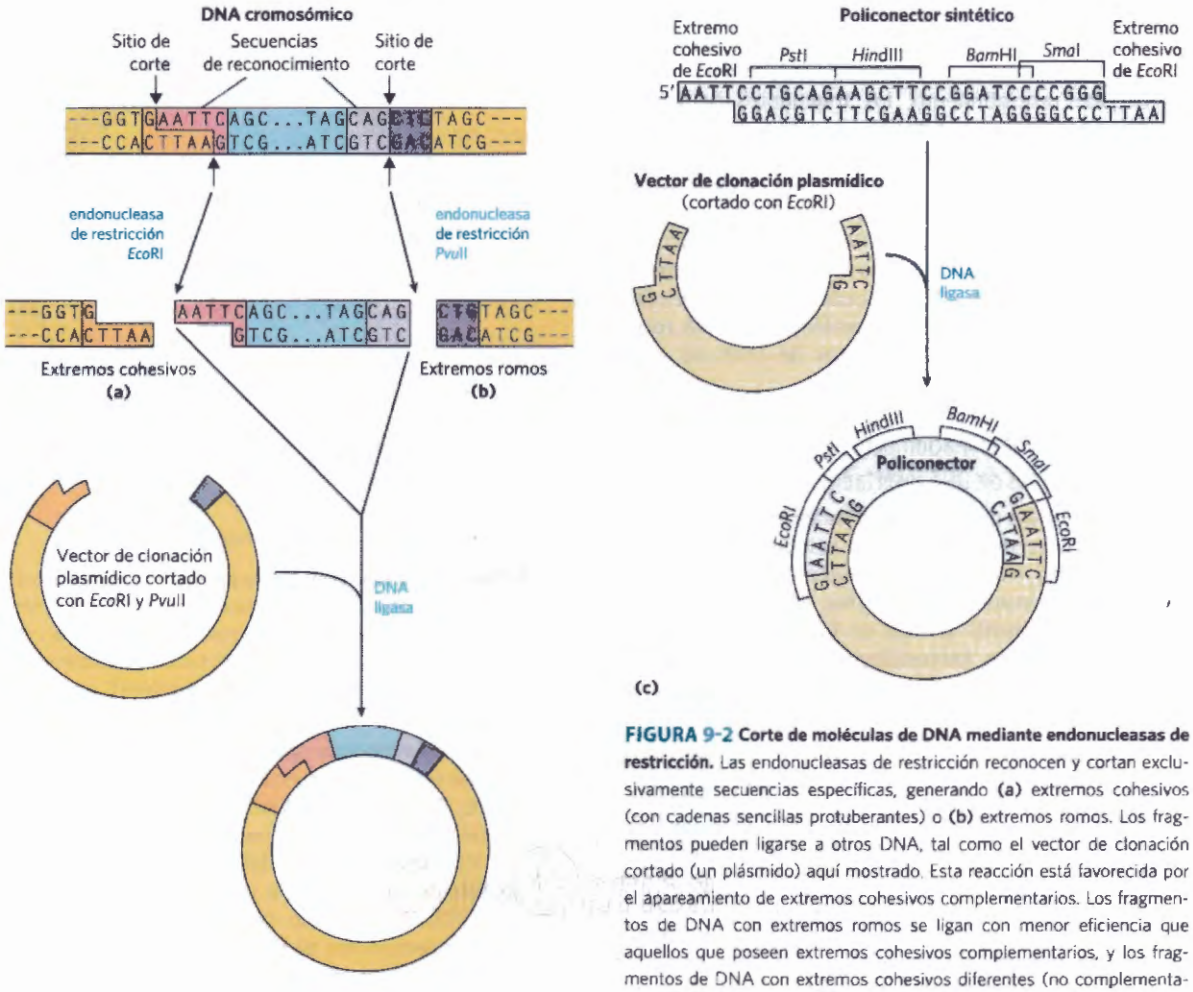


FIGURA 9-2 Corte de moléculas de DNA mediante endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción reconocen y cortan exclusivamente secuencias específicas, generando **(a)** extremos cohesivos (con cadenas sencillas protuberantes) o **(b)** extremos romos. Los fragmentos pueden ligarse a otros DNA, tal como el vector de clonación cortado (un plásmido) aquí mostrado. Esta reacción está favorecida por el apareamiento de extremos cohesivos complementarios. Los fragmentos de DNA con extremos romos se ligan con menor eficiencia que aquellos que poseen extremos cohesivos complementarios, y los fragmentos de DNA con extremos cohesivos diferentes (no complementarios) no suelen ligarse. **(c)** Un fragmento sintético de DNA que contenga las secuencias de reconocimiento para varias endonucleasas de restricción se puede insertar en un plásmido tratado previamente con una endonucleasa de restricción. El inserto se denomina conector; un inserto con múltiples sitios de restricción se denomina policonector.

rado según estos cálculos, porque las secuencias de nucleótidos en el DNA no son al azar y los cuatro nucleótidos no son igualmente abundantes. En los experimentos de laboratorio, el tamaño medio de los fragmentos producidos por rotura de grandes moléculas de DNA por endonucleasas de restricción puede aumentarse, simplemente terminando la reacción antes de que se haya completado. El resultado es un digerido parcial. El tamaño promedio de los fragmentos también puede aumentarse usando una clase especial de endonucleasas, denominadas endonucleasas mensajeras (véase la Fig. 26-37), que reconocen y cortan secuencias de DNA mucho más largas (14-20 pb).

Una vez que una molécula de DNA se ha cortado en fragmentos, un determinado fragmento de tamaño conocido se puede purificar parcialmente por electroforesis de agarosa o acrilamida o por HPLC. Sin embargo, la digestión de un genoma típico de mamífero con una endonucleasa de restricción produce demasiados fragmentos de DNA diferentes para que sea posible el aislamiento de un fragmento en particular. Una etapa intermedia común en la clonación de un gen o de un fragmento de DNA es la construcción de una librería de DNA, o genoteca (descrita en la Sección 9.2).

Un vez aislado el fragmento de DNA deseado, la DNA ligasa permite unirlo a un vector de clonación digerido de forma similar, es decir, un vector digerido con la *misma* endonucleasa de restricción; por ejemplo, un fragmento generado por *Eco*RI generalmente no se unirá a un fragmento generado por *Bam*HI. Como se describe con más detalle en el Capítulo 25, (véase la Fig. 25-16), la DNA ligasa cataliza la formación de nuevos enlaces fosfodiéster, en una reacción que utiliza ATP u otro cofactor similar. El apareamiento de extremos cohesivos complementarios facilita mucho la reacción de ligación (Fig. 9-2a). Los extremos romos también se pueden ligar, aunque con menor eficiencia. Se pueden crear nuevas secuencias de DNA insertando fragmentos de DNA sintéticos (denominados **conectores**) entre los extremos que tienen que ligarse. Los fragmentos de DNA insertados que contienen secuencias de reconocimiento múltiples para endonucleasas de restricción (a menudo útiles como puntos de inserción de otros DNA por corte y ligación) se denominan **policonectores** (Fig. 9-2c).

La eficacia de los extremos cohesivos para la unión selectiva de dos fragmentos de DNA se puso de manifiesto en los primeros experimentos con DNA recombinante. Antes de que las endonucleasas de restricción fuesen ampliamente asequibles, algunos investigadores

encontraron que era posible generar extremos cohesivos por la acción combinada de la exonucleasa del bacteriófago λ y la transferasa terminal (Tabla 9-1). Mediante este procedimiento, los fragmentos de DNA que debían unirse adquirían colas homopoliméricas complementarias. Este método fue utilizado por Peter Lobban y Dale Kaiser en 1971 en los primeros experimentos de unión de fragmentos de DNA naturales. Poco después, en el laboratorio de Paul Berg se utilizaron métodos similares para unir segmentos de DNA del virus 40 de simio (SV40) con DNA procedente del bacteriófago λ, generándose así la primera molécula de DNA recombinante que contenía fragmentos de DNA de especies diferentes.

Los vectores de clonación permiten la amplificación de fragmentos de DNA insertados

Los principios que gobiernan las formas de presentación del DNA recombinante a las células huésped para su clonación y amplificación pueden ilustrarse convenientemente considerando los tres vectores de clonación más comúnmente usados en los experimentos con *E. coli* –plásmidos, bacteriófagos y cromosomas bacterianos artificiales- y un vector usado para clonar grandes fragmentos de DNA en levadura.

Plásmidos Los plásmidos son moléculas de DNA circular que se replican con independencia del cromosoma del huésped. La gran variedad de plásmidos bacterianos naturales tienen tamaños entre 5.000 y 400.000 pb. Muchos de los plásmidos encontrados en las poblaciones bacterianas son poco más que parásitos moleculares, similares a los virus, pero con menor capacidad para transferirse de una célula a otra. Para sobrevivir en la célula huésped, los plásmidos incorporan varias secuencias especializadas que les permiten aprovechar los recursos celulares para su propia replicación y expresión génica.

Los plásmidos naturales poseen un papel simbiótico en la célula. Pueden aportar genes que confieren resistencia a los antibióticos o que realizan nuevas funciones en la célula. Por ejemplo, el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* permite que la bacteria huésped colonice las células de las plantas y aproveche sus recursos. Las mismas propiedades que permiten que los plásmidos sobrevivan y se reproduzcan en los huéspedes bacterianos o eucarióticos, resultan útiles para los biólogos moleculares que pretenden construir un vector para clonar un segmento específico de DNA. El clásico plásmido de *E. coli* pBR322, construido en 1977, es un buen ejemplo de plásmido con características útiles en la mayoría de los vectores de clonación **(Fig. 9-3).**

El plásmido pBR322 posee un **origen de replicación**, **ori**, en el cual los enzimas celulares inician la replicación (véase el Capítulo 25). Esta secuencia es necesaria para propagar el plásmido. Un sistema de regulación asociado mantiene un nivel de 10 a 20 copias de pBR322 por célula.

El plásmido contiene genes que confieren resistencia a los antibióticos tetraciclina (Tet^R) y ampicilina (Amp^R), que permiten la selección de las células que contienen el plásmido intacto o una versión recombinante del mismo (discutido más adelante).

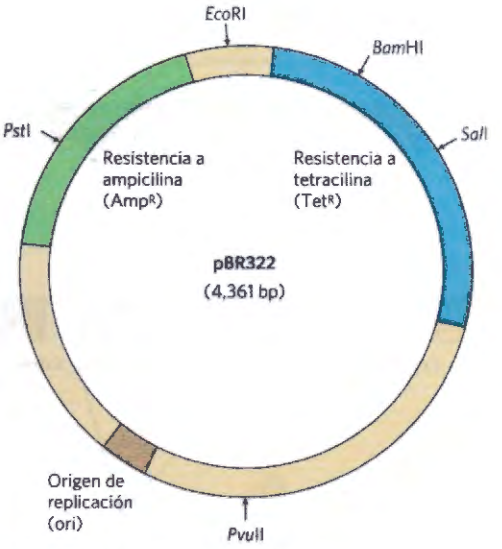


FIGURA 9-3 Diseño del plásmido pBR322. Observe la localización de algunos sitios de restricción importantes para *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I y *Pvu*II; de los genes de resistencia a ampicilina y a tetraciclina y del origen de replicación (ori). Construido en 1977, fue uno de los primeros plásmidos diseñados específicamente para la clonación en *E. coli*.

Varias secuencia únicas en pBR322 son dianas reconocidas por diferentes endonucleasas de restricción (*Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pvu*II), que suministran los sitios dónde cortar el plásmido para insertar el DNA foráneo.

El pequeño tamaño del plásmido (4361 pb) facilita su entrada en las células y la manipulación bioquímica del DNA. El pequeño tamaño se obtuvo eliminando muchas secuencias de DNA, innecesarias para el biólogo molecular, de un plásmido parental mayor.

Los orígenes de replicación insertados en los vectores plasmídicos más comunes proceden de plásmidos naturales. Como en el caso del pBR322, cada uno de estos orígenes de replicación es regulado para mantener un determinado número de copias del plásmido. Según el origen usado, el número de copias del plásmido puede variar entre uno y centenares o millares por célula, lo cual ofrece muchas posibilidades experimentales. Dos plásmidos diferentes no pueden coexistir en la misma célula si usan el mismo origen de replicación, porque la replicación de uno interferiría con la replicación del otro. Estos plásmidos se denominan incompatibles. Cuando interesa introducir dos o más plásmidos diferentes en una célula bacteriana, cada plásmido debe tener un origen de replicación diferente.

En el laboratorio, los plásmidos pequeños pueden introducirse en las células bacterianas mediante un procedimiento denominado **transformación**. Las células (a menudo *E. coli*, aunque también se usan otras especies bacterianas) y el DNA plasmídico se incuban juntos a 0 °C en una disolución de cloruro cálcico y a continuación se someten a un choque térmico consistente en aumentar rápidamente la temperatura hasta entre 37 °C y 43 °C. Por motivos mal conocidos, algunas de las células tratadas de este modo incorporan el DNA plasmídico. Algunas especies bacterianas, como *Acinetobacter baylyi*, son naturalmente competentes para la incorporación del DNA y no requieren el tratamiento con cloruro cálcico y el choque térmico. En un método alternativo, las células

incubadas con el DNA plasmídico son sometidas a un pulso de alto voltaje. Este procedimiento, denominado **electroporación**, permeabiliza transitoriamente la membrana bacteriana para las moléculas grandes.

Con independencia del procedimiento, relativamente pocas células incorporan el DNA plasmídico, por lo tanto se necesita un método para identificarlas. La estrategia usual consiste en utilizar uno o dos tipos de genes del plásmido, denominados marcadores seleccionables o detectables. Los **marcadores seleccionables** tanto pueden permitir el crecimiento de una célula (selección positiva) como matarla (selección negativa) en unas determinadas condiciones. El plásmido pBR322 suministra ejemplos tanto de selección positiva como negativa **(Fig. 9-4)**. Un **marcador detectable** es un gen que codifica una proteína que hace que la célula produzca una molécula coloreada o fluorescente. Las células no resultan dañadas cuando el gen está presente, y las células que contienen el plásmido son fácilmente identificadas por el color o la fluorescencia de las colonias que producen.

La transformación de células bacterianas típicas con DNA purificado (proceso nunca muy eficiente) se vuelve menos eficaz a medida que el tamaño del plásmido aumenta, y es difícil clonar segmentos de DNA más largos de alrededor de 15.000 pb cuando se usa un plásmido como vector.

Para ilustrar el uso de un plásmido como vector de clonación, considere un gen bacteriano típico como el que codifica la recombinasa denominada proteína RecA (véase el Capítulo 25). En la mayoría de bacterias, el gen que codifica RecA es uno entre millares de otros genes en un cromosoma con millones de pares de bases. El gen RecA tiene poco más de 1000 pb de longitud. Un plásmido sería una buena opción para clonar un gen de este tamaño. Como se describe más adelante, el gen clonado puede alterarse de diversas maneras y las variantes del gen pueden expresarse a elevadas concentraciones que permitan la purificación de la proteína codificada.

Cromosomas bacterianos artificiales Los proyectos de secuenciación de genomas de gran tamaño a menudo requieren el clonaje de segmentos de DNA mucho más largos que los que pueden incorporarse en vectores plasmídicos estándar, tales como pBR322. Para responder a esta exigencia se han desarrollado vectores plasmídicos con características especiales que permiten la clonación de segmentos de DNA muy largos (habitualmente entre 100.000 y 300.000 pb). Una vez se han incorporado los grandes segmentos de DNA clonado, estos vectores son suficientemente grandes para ser considerados como cromosomas, y se conocen como **cromosomas bacterianos artificiales**, o **BAC (Fig. 9-5)**.

Un vector BAC (sin DNA clonado insertado) es un plásmido relativamente simple, generalmente no mucho más grande que otros vectores plasmídicos. Para acomodar grandes segmentos de DNA clonado, los vectores BAC tienen orígenes de replicación estables que mantienen una o dos copias del plásmido por célula. Un bajo número de copias es útil en el clonaje de largos segmentos de DNA porque limita las posibilidades de que sucedan reacciones de recombinación no deseadas, que pueden alterar los grandes fragmentos de DNA clona-

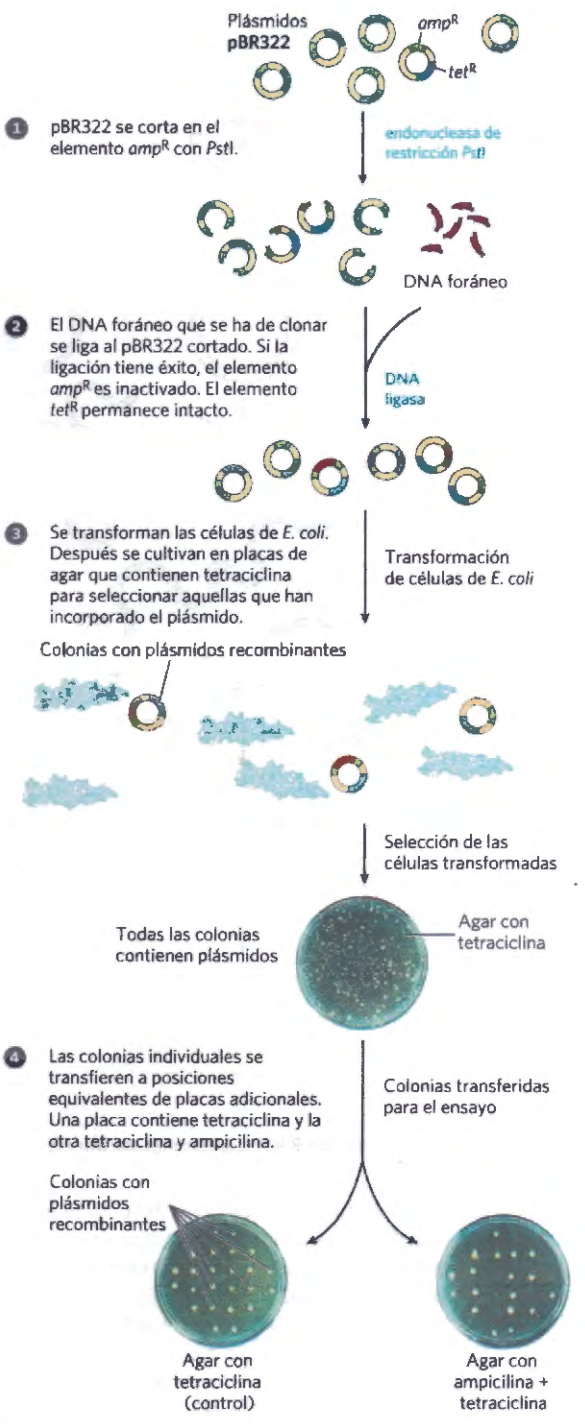
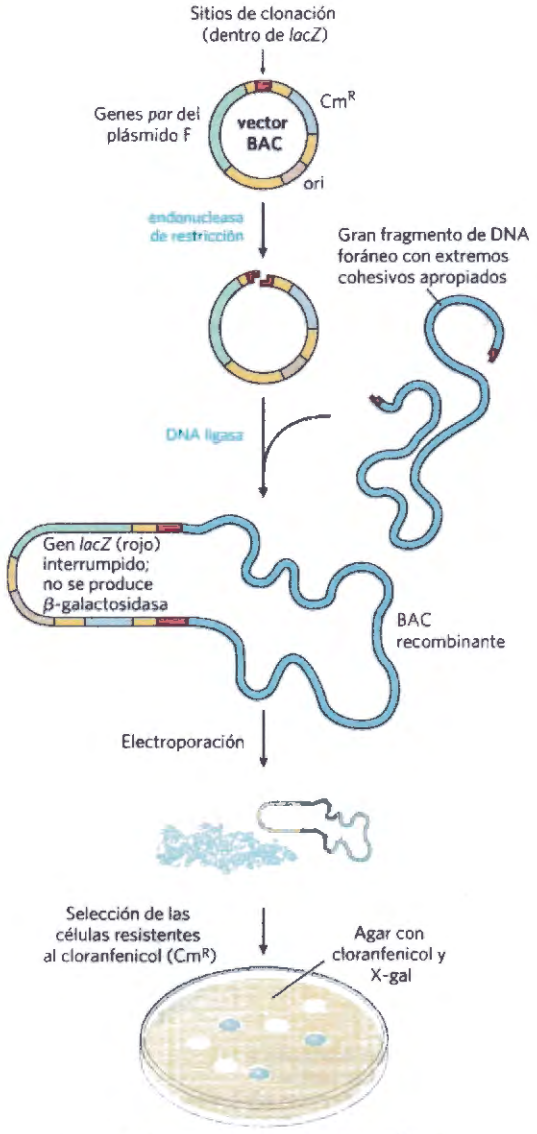


FIGURA 9-4 Clonación e identificación de DNA foráneo en *E. coli* con pBR322. Clonación con plásmidos. [Fuente: Elizabeth A. Wood. Universidad de Wisconsin-Madison. Departamento de Bioquímica.]



Las colonias con BAC recombinantes son blancas

FIGURA 9-5 Cromosomas bacterianos artificiales (BAC) como vectores de clonación. El vector es un plásmido relativamente simple, con un origen de replicación (ori) que dirige la replicación. Los genes *par*, procedentes de un tipo de plásmido, denominado plásmido F, facilitan la distribución uniforme de los plásmidos entre las células hijas en la división celular. Ello favorece que cada célula hija contenga una copia del plásmido, incluso cuando hay pocas copias. Conviene que el número de copias sea bajo al clonar fragmentos de gran tamaño de DNA porque así disminuyen las posibilidades de que se produzcan reacciones de recombinación no deseadas que pueden alterar con el tiempo los DNA grandes clonados. En los BAC se incluyen marcadores seleccionables. Un gen *lacZ* (necesario para la producción del enzima β-galactosidasa) está situado en la región de clonación de manera que sea inactivado por los insertos de DNA clonados. La introducción de BAC recombinantes en las células mediante electroporación es más fácil con células con la pared celular alterada (más porosa). El escrutinio de los DNA recombinantes se efectúa por resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm^R). Las placas también contienen X-gal, un sustrato artificial, de la β-galactosidasa que da un producto de color azul. Las colonias con β-galactosidasa activa y, por lo tanto, sin inserto en el vector BAC, se vuelven azules; las colonias sin actividad β-galactosidasa y, por tanto, con los insertos de DNA deseados, son blancas.

dos de manera impredecible. Los BAC también contienen genes *par*, que codifican proteínas que controlan la correcta distribución de los cromosomas recombinantes entre las células hijas en la división celular, de esta forma aumenta la probabilidad de que cada célula hija contenga una copia, incluso cuando haya pocas copias. El vector BAC contiene a la vez marcadores seleccionables y detectables. El vector BAC mostrado en la Figura 9-5 contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm^R), La selección positiva de las células que contienen el vector se realiza en placas de agar que contienen este antibiótico. Un gen *lac*Z, necesario para la producción del enzima β-galactosidasa, es un marcador detectable que puede revelar qué células contienen plásmidos, ahora cromosomas, que incorporan los segmentos de DNA clonados. La β-galactosidasa cataliza la conversión de la molécula incolora 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (más sencillamiente, X-gal) en un producto azul. Si el gen está intacto y se expresa, la colonia que lo contenga será azul. Si la expresión génica está interrumpida por la introducción de un segmento de DNA clonado, la colonia será blanca.

Cromosomas artificiales de levadura Como en *E. coli*, la genética de las levaduras es bien conocida. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, contiene sólo 14 x 10^6 pb (menos de cuatro veces el tamaño del cromosoma de *E. coli*), y su secuencia se conoce en su totalidad. Las levaduras son también muy fáciles de mantener y de cultivar a gran escala en el laboratorio. Se han construido vectores plasmídicos para levadura, usando los mismos principios que se aplican a los vectores de *E. coli*. Se dispone de métodos eficaces para introducir y extraer DNA de células de levadura, que facilitan el estudio de muchos aspectos de la bioquímica de las células eucarióticas. Algunos plásmidos recombinantes contienen múltiples orígenes de replicación y otros elementos que hacen posible su uso en más de una especie (por ejemplo, en levadura y en *E. coli*). Los plásmidos que pueden propagarse en células de dos o más especies diferentes se denominan **vectores lanzadera**.

El trabajo con grandes genomas que exigen vectores de clonación de gran capacidad llevó al desarrollo de los **cromosomas artificiales de levadura** o **YAC (Fig. 9-6)**. Los vectores YAC contienen todos los elementos necesarios para mantener un cromosoma eucariótico en el núcleo de la levadura: un origen de replicación de levadura, dos marcadores seleccionables y secuencias especializadas (derivadas de los telómeros y el centrómero), necesarias para la estabilidad y la segregación correcta de los cromosomas en la división celular (véase el Capítulo 24). Antes de usarse en la clonación, el vector se propaga en forma de plásmido bacteriano circular y, a continuación, se aísla y purifica. El corte con una endonucleasa de restricción (*Bam*H1 en la Fig. 9-6) elimina un trozo de DNA entre dos secuencias teloméricas (TEL), dejando los telómeros en los extremos del DNA linealizado. El corte en otro sitio interno (por *Eco*RI en la Fig. 9-6) divide el vector en dos segmentos de DNA, denominados brazos del vector, cada uno con un marcador seleccionable distinto.

El DNA genómico se prepara por digestión parcial con endonucleasas de restricción para obtener un fragmento del tamaño adecuado. Los fragmentos genómicos se separan por **electroforesis en gel de campo pulsante,** una variante de la electroforesis en gel (véase la Fig. 3-18) que permite la separación de trozos de DNA muy grandes. Los fragmentos de DNA de tamaño apropiado (hasta unos 2 x 10^6 pb) se mezclan y se ligan con los brazos del vector. La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar células de levadura (previamente tratadas para degradar parcialmente sus paredes celulares) con esta moléculas de DNA muy grandes y que ahora tienen la estructura y el tamaño adecuados para ser considerados cromosomas de levadura. El cultivo en un medio que requiera la presencia de los dos marcadores genéticos seleccionables asegura que sólo crezcan las células de levadura que contengan un cromosoma artificial con un gran inserto entre los dos brazos del vector (Fig. 9-6). La estabilidad de los clones YAC aumenta con el tamaño del segmento de DNA clonado hasta un límite determinado. Los que poseen insertos de más de 150.000 pb son casi tan estables como los cromosomas celulares normales, mientras que con insertos de menos de 100.000 pb van perdiéndose paulatinamente durante la mitosis (por ello generalmente no se encuentran clones de levadura con sólo los extremos del vector ligados o con insertos cortos). Los YAC que carecen de un telómero en cualquiera de los extremos son rápidamente degradados.

Como en el caso de los BAC, los vectores YAC sirven para clonar grandes segmentos de DNA. Además, el DNA clonado en un YAC puede modificarse para estudiar la función de secuencias especializadas en el metabolismo de los cromosomas, los mecanismos de regulación y expresión génica y muchos otros problemas de la biología molecular eucariótica.

La expresión de genes clonados puede producir grandes cantidades de proteína

Frecuentemente, más que en el gen en sí mismo, el interés principal reside en su producto, sobre todo si la proteína tiene valor comercial, terapéutico o para la investigación. Las proteínas purificadas se usan con variados propósitos, entre los que se cuentan el estudio de la función proteica, el estudio de los mecanismos de reacción, la obtención de anticuerpos contra las proteínas, la reconstitución de actividades celulares complejas en el tubo de ensayo a partir de componentes purificados y el examen de las propiedades de unión de las proteínas. Los avances del conocimiento del metabolismo del DNA, el RNA y las proteínas y su regulación en un organismo huésped como *E. coli* o levadura han permitido manipular las células para que expresen genes clonados a fin de estudiar sus productos proteicos. El objetivo general consiste en alterar las secuencias alrededor de un gen clonado para inducir en el organismo huésped la síntesis de grandes cantidades del producto proteico de un gen. La sobreexpresión de una proteína puede hacer que su purificación sea mucho más fácil.

A modo de ejemplo, examinaremos la expresión de una proteína eucariótica en una bacteria. Los genes eucarióticos poseen secuencias en su entorno que son

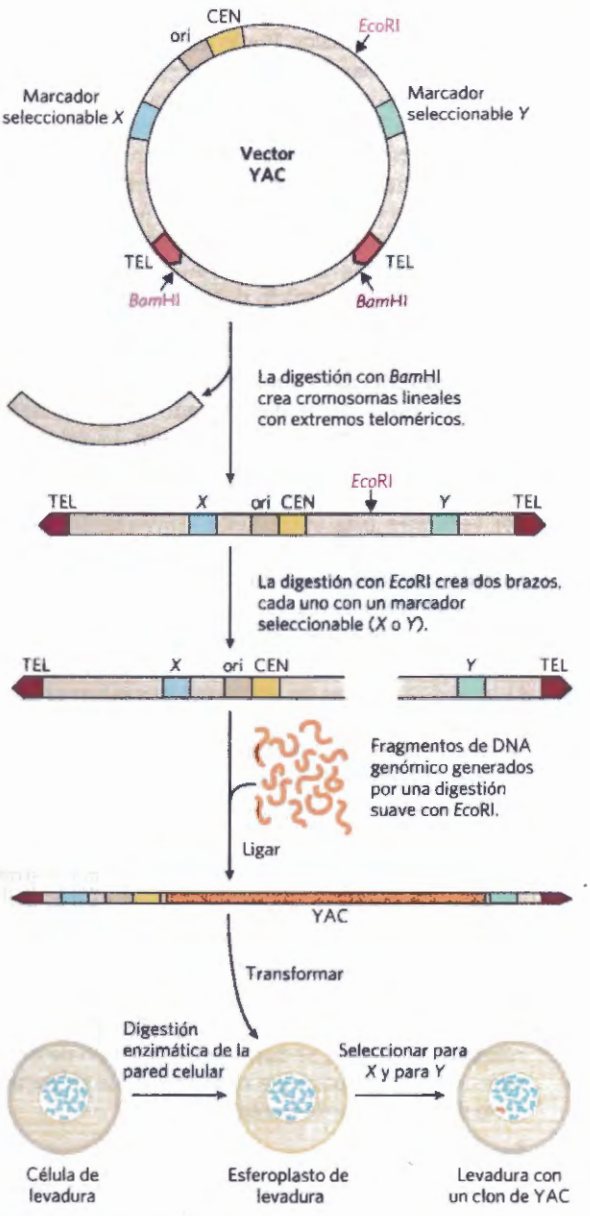


FIGURA 9-6 Construcción de un cromosoma artificial (YAC) de levadura. Un vector YAC contiene un origen de replicación (ori), un centrómero (CEN), dos telómeros (TEL) y marcadores seleccionables (X e Y). La digestión con *Bam*H1 y *Eco*RI genera dos brazos de DNA separados, cada uno con un extremo telomérico y un marcador seleccionable. Es posible ligar un gran segmento de DNA (por ejemplo, de hasta 2x10^6 pb de un cromosoma humano) con los dos brazos para crear un cromosoma artificial de levadura. El YAC transforma células de levadura (preparadas mediante eliminación de la pared celular paras formar esferoplastos) que serán seleccionadas con respecto a X e Y; las células de levadura supervivientes propagarán el inserto de DNA.

necesarias para su transcripción y regulación en las células de las que proceden, pero estas secuencias no son funcionales en las bacterias. Por tanto, los genes eucarióticos carecen de las secuencias de DNA requeridas para su expresión controlada en las células bacterianas: promotores (secuencias que indican a la RNA polimerasa dónde debe unirse para iniciar la síntesis de mRNA), sitios de unión a ribosomas (secuencias que permiten la

traducción del mRNA a proteína) y otras secuencias reguladoras adicionales. Por lo tanto, es necesario insertar las secuencias reguladoras bacterianas apropiadas para la transcripción y la traducción en las posiciones correctas del DNA vector en relación con el gen eucariótico. En ciertos casos, los genes clonados se expresan tan eficientemente que su producto proteico representa el 10% o más de la proteína celular. A estas concentraciones, algunas proteínas foráneas pueden matar a la célula huésped (generalmente *E. coli*), por lo que la expresión del gen clonado debe limitarse a unas pocas horas antes de la recuperación de las células.

Los vectores de clonación que contienen las señales de transcripción y traducción necesarias para regular la expresión de un gen clonado se denominan frecuentemente **vectores de expresión**. La velocidad de expresión del gen clonado se controla reemplazando las secuencias reguladoras del propio promotor del gen por versiones más eficientes y convenientes suministradas por el vector. En general, para la clonación se coloca un promotor bien caracterizado con sus elementos reguladores cerca de varios sitios de restricción únicos, de manera que los genes insertados en los sitios de restricción se expresen bajo el control del promotor **(Fig. 9-7)**. Algunos de estos vectores incorporan otras características, como lugares de unión al ribosoma bacteriano para mejorar la traducción del mRNA derivado del gen (Capítulo 27) o una secuencia de terminación de la transcripción (Capítulo 26).

Para expresar proteínas recombinantes se usan muchos sistemas diferentes

Todos los organismos vivos tienen capacidad para expresar los genes de su DNA genómico; por tanto, en principio, cualquier organismo puede servir de huésped para expresar proteínas de una especie diferente (heterólogas). De hecho, se han usado todo tipo de organismos con este propósito, y cada tipo tiene su particular serie de ventajas y desventajas.

Bacterias Las bacterias, especialmente *E. coli*, siguen siendo los huéspedes más comunes para la expresión de proteínas. Las secuencias reguladoras que gobiernan la expresión génica en *E.coli* y en muchas otras bacterias son bien conocidas, y pueden aprovecharse para expresar proteínas clonadas a un nivel elevado. Las bacterias son fáciles de almacenar y de cultivar en el laboratorio en medios de bajo costo. También se dispone de métodos eficientes para introducir DNA en las bacterias y para extraerlo. Las bacterias pueden cultivarse en grandes cantidades en fermentadores comerciales que garanticen el suministro de proteína clonada. Sin embargo, pueden presentarse dificultades. Cuando se expresan en bacterias, algunas proteínas heterólogas no se pliegan correctamente, y muchas no sufren las modificaciones covalentes o los cortes proteolíticos que pueden ser necesarios para su actividad. Ciertas características de una secuencia génica pueden dificultar la expresión de un gen particular en las bacterias. Por ejemplo, las regiones intrínsecamente desordenadas son más comunes en las proteínas eucarióticas. Cuando se expresan en bacterias, muchas proteínas eucarióticas se agregan y forman precipitados insolubles, denominados cuerpos de inclusión. Por estas y muchas otras razones, algunas proteínas eucarióticas son inactivas cuando se purifican a partir de bacterias, o incluso puede que no se expresen en absoluto. Para contribuir a resolver estos problemas, constantemente se desarrollan nuevas cepas bacterianas huésped que incorporan mejoras como la presencia de chaperonas de proteínas eucarióticas o enzimas que modifican las proteínas expresadas.

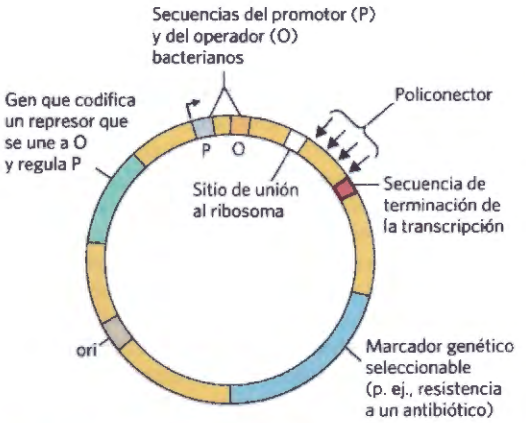


FIGURA 9-7 Secuencias de DNA en un vector de expresión típico de *E. coli*. Se inserta el gen que se desea expresar en uno de los sitios de restricción del policonector, cerca del promotor **(P)**, con el extremo del gen que codifica el amino terminal de la proteína posicionado cerca del promotor. El promotor posibilita una transcripción eficiente del gen insertado, y la secuencia de terminación de la transcripción en ocasiones mejora la cantidad y estabilidad del mRNA producido. El operador **(O)** permite la regulación mediante un represor con el cual se une. El sitio de unión al ribosoma contiene las señales para una traducción eficiente del mRNA derivado del gen. El marcador seleccionable permite la selección de las células que contienen el DNA recombinante.

Hay muchos sistemas especializados para expresar proteínas en bacterias. El promotor y las secuencias reguladoras asociadas al operón lactosa (véase el Capítulo 28) a menudo se unen al gen que debe expresarse para controlar la transcripción. El gen clonado se transcribirá cuando se añada lactosa al medio de cultivo. Sin embargo, la regulación del sistema de la lactosa es defectuosa y la transcripción no se encuentra totalmente desactivada en ausencia de lactosa lo que puede representar un problema potencial si el producto del gen clonado es tóxico para las células huésped. La eficiencia de la trascripción a partir del promotor Lac tampoco es suficientemente eficiente para algunas aplicaciones.

Un sistema alternativo utiliza un promotor y la RNA polimerasa de un virus bacteriano denominado bacteriófago T7. Si el gen clonado se empalma con un promotor de T7 no será transcrito por la RNA polimerasa de T7, sino, por el contrario, por la RNA polimerasa de T7. El gen que codifica esta polimerasa se clona separadamente en la misma célula en una construcción que garantiza una regulación estricta (que permita la producción controlada de la RNA polimerasa de T7). La polimerasa también es muy eficiente y sostiene elevados niveles de expresión de la mayoría de genes empalmados con el promotor de T7. Este sistema se ha utilizado para expresar la proteína RecA en células bacterianas **(Fig. 9-8)**.

Levadura La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es probablemente el organismo eucariótico mejor conocido y uno de los más fáciles de cultivar y manipular en el laboratorio. Al igual que las bacterias, esta levadura puede cultivarse en medios de bajo coste. La levadura posee una pared celular muy resistente, que es difícil de alterar para introducir vectores de DNA. Por este motivo las bacterias son más adecuadas para realizar la mayor parte de la ingeniería genética y el mantenimiento del vector. El vector de levadura se propaga, pues, inicialmente en bacterias. Se dispone de varios excelentes vectores lanzadera para este propósito.

Los principios subyacentes a la expresión de proteínas en levadura son los mismos que en las bacterias. Los genes clonados deben empalmarse con promotores que garanticen un elevado nivel de expresión en levadura. Por ejemplo, los genes de levadura *GAL1* y *GAL10* están regulados en las células de forma que se expresan cuando las células de levadura se cultivan en un medio con galactosa, pero se reprimen cuando las células se cultivan en glucosa. Por tanto, si se expresa un gen heterólogo utilizando las mismas secuencias reguladoras, puede controlarse su expresión simplemente eligiendo el medio apropiado para el crecimiento celular.

Algunos de los problemas que se encuentran en la expresión de proteínas en bacterias también aparecen en levaduras. Las proteínas heterólogas pueden no plegarse correctamente, la levadura puede carecer de los enzimas necesarios para modificar las proteínas para su activación o la expresión de las proteínas puede verse comprometida por ciertas características de las secuencias génicas. Sin embargo, puesto que la levadura *S. cerevisiae* es un eucariota, la expresión de genes eucarióticos (especialmente los genes de levadura) es a veces más eficiente en este huésped que en las bacterias. El plegamiento y la modificación de los productos pueden también ser más precisos que para las proteínas expresadas en bacterias.

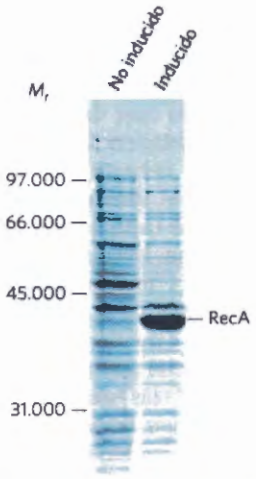


FIGURA 9-8 Expresión regulada de la proteína RecA en una célula bacteriana. El gen que codifica la proteína RecA, ligado a un promotor del bacteriófago T7, se clona en un vector de expresión. En condiciones de crecimiento normales (sin inducción) no se sintetiza la proteína RecA. Cuando se induce en la célula la RNA polimerasa de T7, se expresa el gen *recA* y se producen grandes cantidades de proteína RecA. Se indican las posiciones de los marcadores de masa molecular analizados en el mismo gel. [Fuente: Rachel Britt, Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison.]

Insectos y virus de insectos Los **baculovirus** son virus de insectos con genomas de DNA de doble cadena. Cuando infectan las larvas de sus insectos huésped se comportan como parásitos y matan las larvas para convertirlas en factorías de producción de virus. Hacia el final del proceso infeccioso, los virus producen grandes cantidades de dos proteínas (p10 y poliedrina), ninguna de las cuales es necesaria para la producción de virus en células de insectos en cultivo. Los genes de ambas proteínas pueden sustituirse por el gen de una proteína heteróloga. Cuando los virus recombinantes resultantes se usan para infectar larvas o células de insecto, la proteína heteróloga se sintetiza a menudo en cantidades muy grandes: hasta el 25% de la proteína total presente al final del ciclo de infección.

El nucleopoliedrovirus multicápsida (AcMNPV) de *Autographa californica* es el **baculovirus** más utilizado para la expresión de proteínas. Tiene un genoma de gran tamaño (134.000 pb), demasiado grande para el clonaje directo. La purificación del virus también es muy laboriosa. Estos problemas se han resuelto con el desarrollo de los **bácmidos**, grandes moléculas de DNA circular, que contienen el genoma completo del baculovirus junto con secuencias que permiten la replicación del bácmido en *E. coli* **(Fig. 9-9)**. El gen a estudiar se clona en un plásmido menor y se combina con el plásmido mayor por recombinación específica de sitio in vivo (véase la Fig. 25-38). A continuación el bácmido recombinante se aísla y se transfecta en las células de insecto (el término **transfección** se utiliza cuando el DNA usado para la transformación contiene secuencias víricas que conducen a la replicación del virus), y la proteína recombinante se recupera una vez finalizado el ciclo infeccioso. Se dispone de una amplia variedad de sistemas comerciales basados en bácmidos. Los sistemas de baculovirus no dan buenos resultados con todas las proteínas. Sin embargo, con estos sistemas las células de insecto son capaces, a veces, de reproducir los patrones de modificación de las proteínas de los eucariotas superiores y producir proteínas eucarióticas activas correctamente modificadas.

Células de mamífero en cultivo La manera más conveniente para introducir genes clonados en células de mamífero es mediante virus. Este método aprovecha la capacidad natural de los virus para insertar su DNA o RNA en una célula, y a veces en el cromosoma celular. Se dispone de un gran número de virus de mamífero modificados que pueden actuar de vectores, incluyendo adenovirus humanos y retrovirus. El gen utilizado se clona de manera que su expresión esté controlada por un promotor viral. El virus utiliza sus mecanismos de infección naturales para introducir el genoma recombinante en las células, donde se expresa la proteína clonada. Estos sistemas tienen la ventaja de que las proteínas se pueden expresar de manera transitoria (si el DNA vírico se mantiene separado del genoma de la célula huésped y finalmente degradado) o permanente (si el DNA vírico se integra en el genoma de la célula huésped). El acierto en la elección de la célula huésped asegura la correcta modificación post-traducción, que garantiza la obtención de la forma activa de la proteína. Sin embargo, el mantenimiento de células eucarióticas

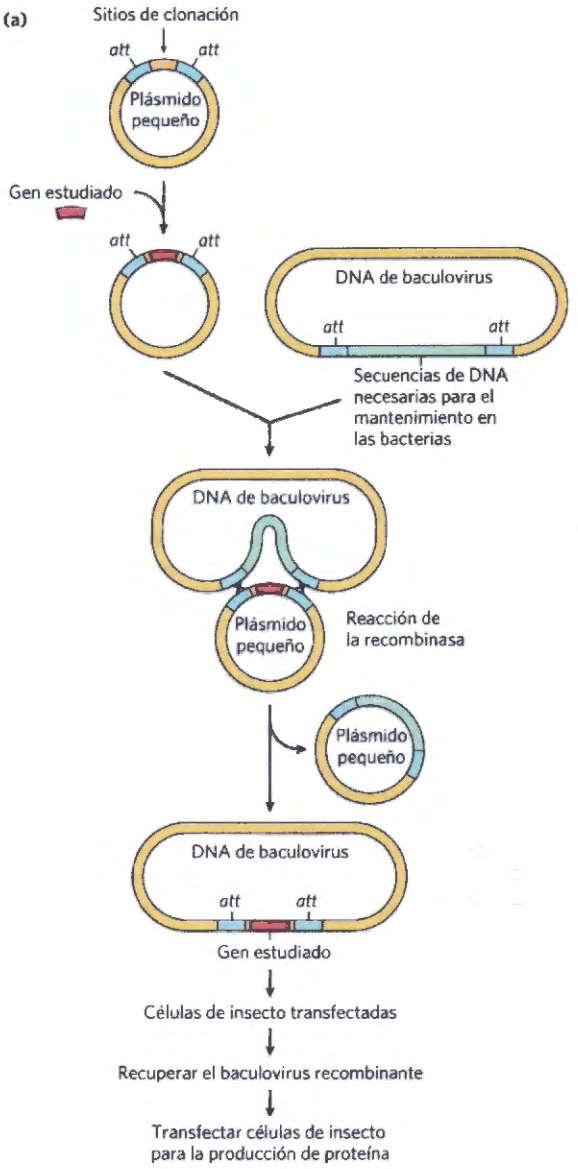


FIGURA 9-9 Clonación con baculovirus. (a) Se muestra la construcción de un vector típico usado para la expresión de proteínas en baculovirus. El gen estudiado se clona en un pequeño plásmido (izquierda) entre dos sitios (*att*) reconocidos por una recombinasa específica de sitio y a continuación se introduce en el vector de baculovirus por recombinación específica de sitio (véase la Fig. 25-37). El DNA circular obtenido se usa para infectar las células de una larva de insecto. El gen estudiado se expresa durante el ciclo infectivo bajo el control de un promotor que normalmente expresa una proteína de la cápsida del baculovirus a niveles muy elevados. **(b)** Las fotografías muestran (izquierda) una larva de insecto infectada por un vector recombinante de baculovirus que expresa una proteína que produce un color rojo y (derecha) una larva no infectada. [Fuente: (b) USDA-ARS.]

en cultivo es muy caro, y esta tecnología se usa generalmente para estudiar la función de una proteína in vivo, más que para producir una proteína en grandes cantidades

La alteración de los genes clonados produce proteínas modificadas

Las técnicas de clonación pueden usarse no sólo para obtener grandes cantidades de proteína, sino también para producir proteínas poco o muy alteradas. Se pueden cambiar aminoácidos individuales mediante **mutagénesis dirigida.** Esta técnica ha influido muy positivamente en el estudio de las proteínas al permitir la introducción de cambios específicos de la estructura primaria y examinar los efectos de estos cambios en el plegamiento de las proteínas, la estructura tridimensional y la actividad. En esta poderosa metodología para el estudio de la estructura y función de las proteínas, los cambios de la secuencia de aminoácidos se introducen mediante la alteración de la secuencia del gen clonado. Si la secuencia que se pretende modificar está flanqueada por lugares de restricción apropiados, se puede realizar el cambio simplemente por sustitución del segmento origina de DNA por un segmento sintético idéntico al original excepto en el cambio deseado **(Fig. 9-10a)**.

Si no hay lugares de restricción localizados adecuadamente, la **mutagénesis dirigida por oligonucleótido** puede generar un cambio específico en la secuencia del DNA (Fig. 9-10b). Dos cadenas complementarias de DNA sintético cortas, cada una con el cambio de base deseado se hibridan a las hebras opuestas del gen clonado dentro de un vector adecuado de DNA circular. Una base desapareada entre 30 o 40 pb no impide la hibridación. Los dos oligonucleótidos apareados sirven de cebador para la síntesis de DNA en ambas direcciones alrededor del vector plasmídico, creándose así dos cadenas complementarias que contienen la mutación. Después de varios ciclos de amplificación selectiva mediante la técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR, véase Fig. 8-33), el DNA que contiene la mutación predomina en la población y puede usarse para transformar las bacterias. La mayoría de las bacterias transformadas contendrán plásmidos con la mutación. Si es necesario, el DNA del plásmido molde no mutante puede eliminarse selectivamente por corte con el enzima de restricción *Dpn*I. El plásmido molde, normalmente aislado a partir de *E. coli* de tipo salvaje, tiene un residuo de A metilado en cada copia del palíndromo de cuatro nucleótidos GATC (denominado sitio dam; véase la Fig. 25-31). El nuevo DNA que contiene la mutación no tiene los residuos de A metilados porque la replicación tiene lugar in vitro. *Dpn*I corta selectivamente el DNA en la secuencia GATC solamente si el residuo A en una o en

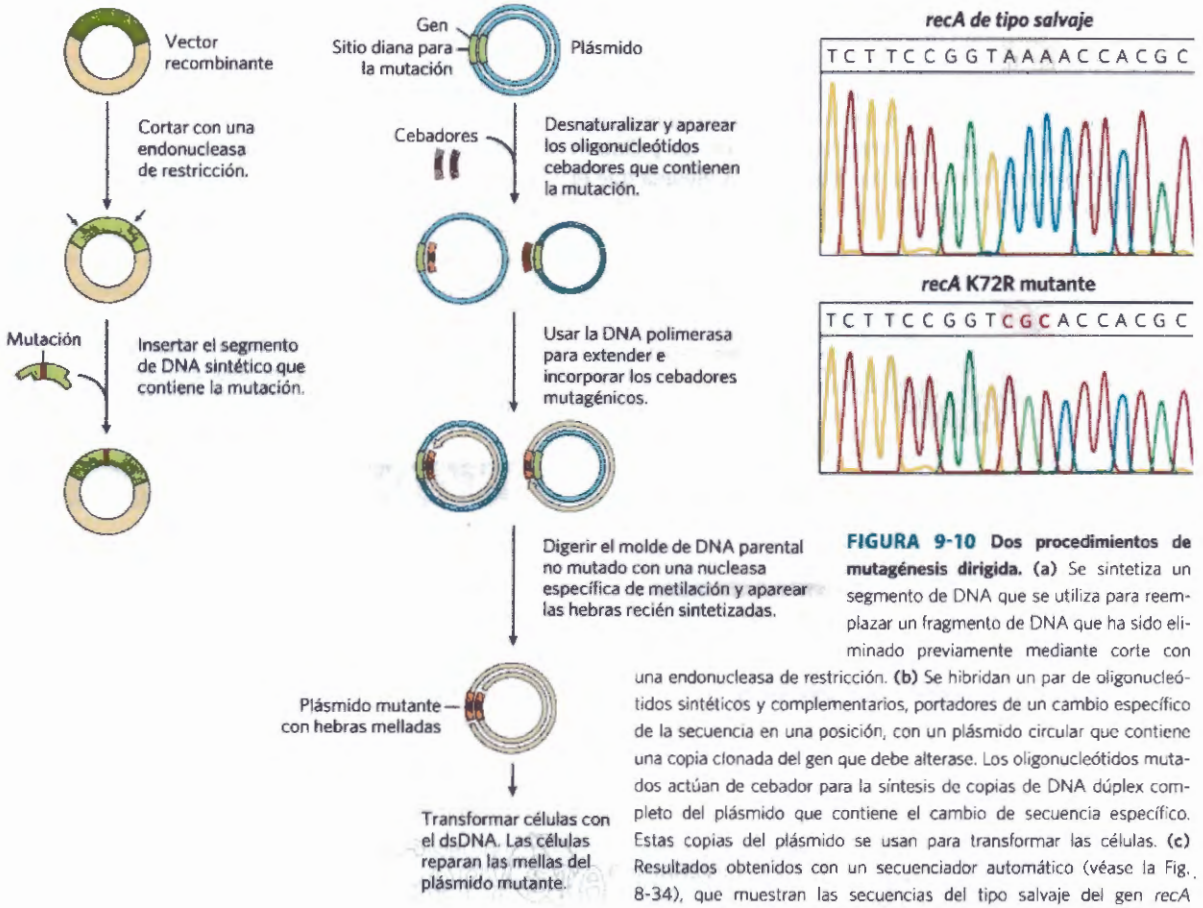


FIGURA 9-10 Dos procedimientos de mutagénesis dirigida. (a) Se sintetiza un segmento de DNA que se utiliza para reemplazar un fragmento de DNA que ha sido eliminado previamente mediante corte con una endonucleasa de restricción. **(b)** Se hibridan un par de oligonucleótidos sintéticos y complementarios, portadores de un cambio específico de la secuencia en una posición, con un plásmido circular que contiene una copia clonada del gen que debe alterase. Los oligonucleótidos mutados actúan de cebador para la síntesis de copias de DNA dúplex completo del plásmido que contiene el cambio de secuencia específico. Estas copias del plásmido se usan para transformar las células. **(c)** Resultados obtenidos con un secuenciador automático (véase la Fig. 8-34), que muestran las secuencias del tipo salvaje del gen *recA* (arriba) y de un gen *recA* (abajo) con el triplete (codon) en posición 72 cambiado de AAA a CGC, que especifica un residuo de Arg (R) en lugar de un residuo de Lys **(K)**. [Fuente: (c) Elizabeth A. Wood, University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry.]

las dos cadenas está metilado; es decir, degrada solamente el molde.

Por ejemplo, volvamos al gen bacteriano *rec*A. El producto de este gen, la proteína RecA, tiene diversas actividades (véase la Sección 25.3). Se une al DNA formando una estructura filamentosa, alinea dos DNA de secuencia similar e hidroliza ATP. Un residuo aminoácido concreto de RecA (un polipéptido de 352 residuos), el residuo Lys en la posición 72, está implicado en la hidrólisis del ATP. Al cambiar la Lys^{72} por una Arg se obtiene una variante de RecA que une pero no hidroliza ATP (Fig. 9-10c). La modificación y purificación de esta variante de RecA ha facilitado la investigación sobre el papel de la hidrólisis del ATP en el funcionamiento de esta proteína.

Se pueden introducir cambios en un gen en donde intervengan mucho más que un par de bases. Se pueden suprimir partes importantes de un gen, cortando un segmento con endonucleasas de restricción y ligando las porciones restantes para formar un gen más pequeño. Por ejemplo, si una proteína tiene dos dominios, el segmento del gen que codifica uno de los dominios se puede eliminar para producir una proteína que sólo posea un dominio de los dos originales. Se pueden ligar partes de genes diferentes para crear nuevas combinaciones. El producto de este tipo de genes se conoce como **proteína de fusión.** Se dispone de métodos ingeniosos para realizar prácticamente cualquier tipo de alteración genética in vitro. La reintroducción del DNA modificado en la célula permite investigar las consecuencias de la alteración.

Las etiquetas terminales crean sitios de unión para la purificación por afinidad

La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más eficientes para la purificación de proteínas (véase la Fig. 3-17c). Lamentablemente hay muchas proteínas que no se unen a un ligando que pueda ser inmovilizado convenientemente sobre un medio cromatográfico. Sin embargo, el gen de prácticamente cualquier proteína puede modificarse para expresar una proteína de fusión que pueda purificarse por cromatografía de afinidad. El gen que codifica la proteína de interés se acopla al gen que codifica un péptido o una proteína que se una a un ligando sencillo y estable con elevada afinidad y especificidad. El péptido o proteína usados con este propósito se denominan **etiqueta**. Las secuencias etiqueta se pueden añadir a los genes de manera que las proteínas resultantes tengan la etiqueta en el extremo amino o en el extremo carboxilo terminal. Algunas proteínas y péptidos usados frecuentemente como etiquetas se muestran en la Tabla 9-3.

El procedimiento general puede ilustrarse con la etiqueta glutatión-S-transferasa (GST) **(Fig. 9-11)**. La GST es un enzima pequeño (M_r 26.000) que se une fuerte y específicamente al glutatión. Si la secuencia génica de la GST se une al gen estudiado, la proteína de

fusión adquiere la propiedad de unirse al glutatión. La proteína de fusión se expresa en una bacteria o en otro organismo huésped, a partir del cual se prepara un extracto crudo. Se llena una columna con una matriz porosa, consistente en el ligando (glutatión) inmovilizado sobre las partículas microscópicas de un polímero estable como la agarosa entrecruzada. A medida que el extracto crudo fluye a través de la columna, la proteína de fusión es inmovilizada por unión al glutatión. Las demás proteínas del extracto pasan de largo a través de la columna y son descartadas. La interacción entre la GST y el glutatión es fuerte, pero no covalente, lo que hace posible la elución suave de la proteína de fusión utilizando una disolución que contenga una concentración de sal o de glutatión libre mas elevada que compita con el ligando inmovilizado por la unión de la GST. Las proteínas de fusión pueden obtenerse a menudo con un buen rendimiento y elevada pureza con este procedimiento. En algunos sistemas comercialmente disponibles, la etiqueta puede eliminarse parcial o completamente de la proteína de fusión purificada utilizando una proteasa que corta la secuencia cerca de la unión entre la proteína y su etiqueta.

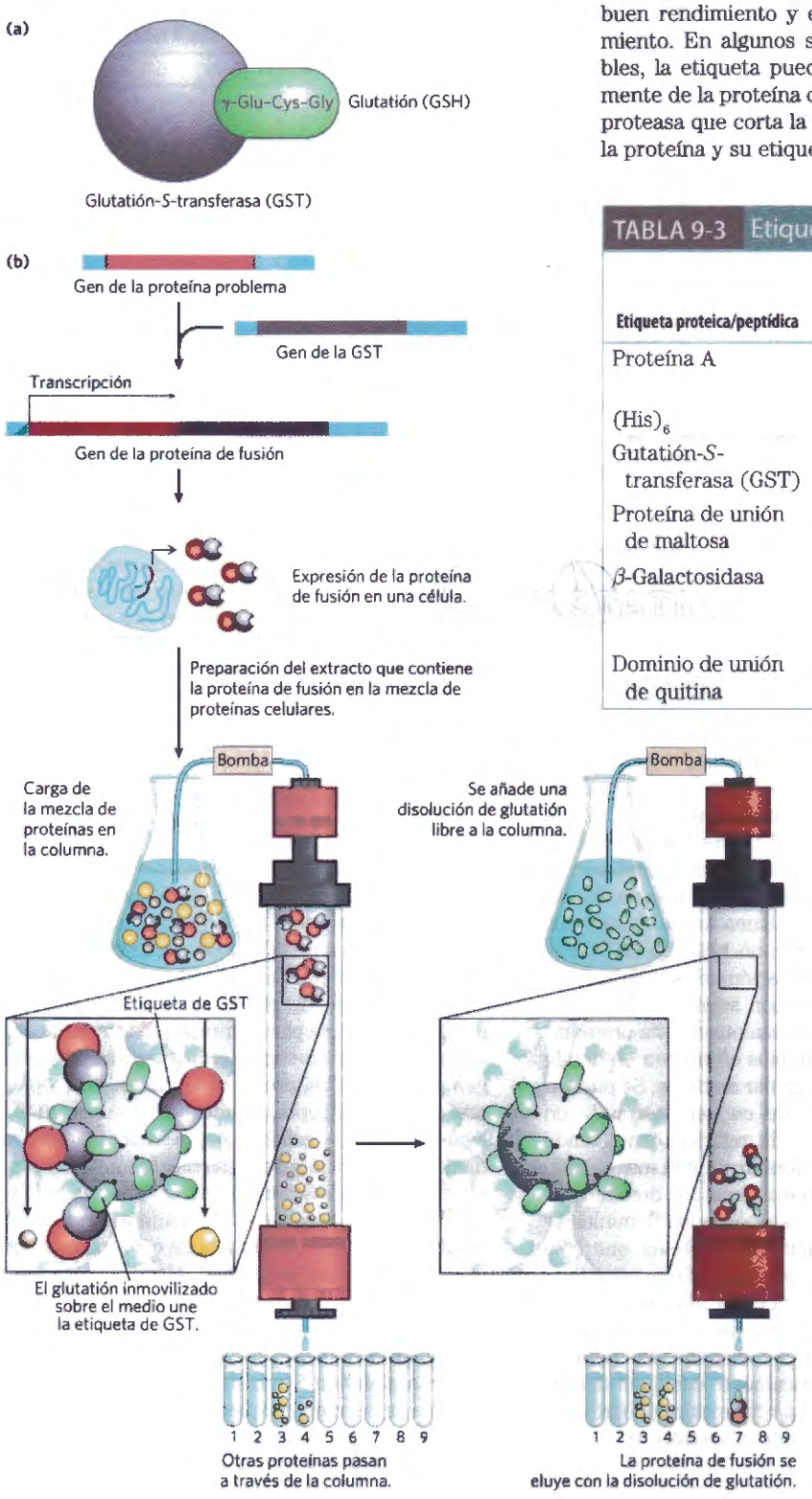


TABLA 9-3 Etiquetas proteicas de uso común

Etiqueta proteica/peptídica	Masa molecular (kDa)	Ligando inmovilizado
Proteína A	59	Porción Fc de una IgG
$(His)_6$	0,8	Ni^{2+}
Gutatión-*S*-transferasa (GST)	26	Glutatión
Proteína de unión de maltosa	41	Maltosa
β-Galactosidasa	116	*p*-Aminofenil-β-D-tiogalactósido (TPEG)
Dominio de unión de quitina	5,7	Quitina

FIGURA 9-11 Aplicación del etiquetado en la purificación de proteínas. (a) La glutatión-S-transferasa (GTS) es un pequeño enzima que se une al glutatión (un dipéptido Cys-Gly unido al carbono carboxílico de la cadena lateral de un residuo de glutamato, de ahí la abreviatura GSH). **(b)** La etiqueta GST se une al extremo carboxilo de la proteína por ingeniería genética. La proteína etiquetada se expresa en la célula y está presente en el extracto crudo cuando se lisan las células. El extracto se cromatografía en una columna de afinidad que contiene un medio con glutatión inmovilizado (Fig. 3-17c). La proteína etiquetada con GST se une al glutatión, con el consiguiente retardo de la migración a través de la columna, mientras que las restantes proteínas pasan rápidamente sin ser retenidas. La proteína etiquetada se eluye de la columna con una disolución que contenga una elevada concentración salina o glutatión libre.

Una etiqueta más pequeña muy usada consiste en una secuencia sencilla de seis o más residuos de histidina. Estas etiquetas de histidina o etiquetas His se unen fuerte y específicamente a iones níquel. Se pueden usar, pues, medios cromatográficos con Ni^{2+} inmovilizado para separar rápidamente proteínas etiquetadas con His de otras proteínas presentes en un extracto. Se pueden usar etiquetas mayores, como la proteína de unión de maltosa, para mejorar la solubilidad y la estabilidad y así permitir la purificación de proteínas clonadas que de otro modo serían inactivas debido a un plegamiento incorrecto o a su insolubilidad.

La cromatografía de afinidad con utilización de etiquetas terminales es conveniente y eficaz y se ha usado en millares de estudios publicados; en muchos casos, sin la etiqueta sería imposible purificar la proteína y estudiarla. Sin embargo, incluso las etiquetas más pequeñas pueden afectar las propiedades de las proteínas a las que están unidas e influir en los resultados. Por ejemplo, la etiqueta puede afectar negativamente el plegamiento de la proteína. La actividad puede verse afectada incluso cuando las etiquetas se eliminan con proteasas si uno o unos pocos residuos aminoácidos permanecen asociados a la proteína. Los tipos de experimentos que se realizan con proteínas etiquetadas deberían siempre ser evaluados con ayuda de controles bien diseñados para valorar el efecto de la etiqueta en la función de la proteína.

La reacción en cadena de la polimerasa puede adaptarse para convertirse en un eficaz método de clonaje

El diseño cuidadoso de los cebadores usados en la PCR (véase la Fig. 8-33) permite modificar el segmento amplificado, incluyendo en cada extremo DNA adicional que no esté presente en el cromosoma objeto de estudio. Por ejemplo, pueden introducirse lugares de corte para enzimas de restricción para facilitar la ulterior clonación del DNA amplificado **(Fig. 9-12).**

Numerosas adaptaciones especializadas han aumentado la utilidad de la PCR. Por ejemplo, es posible amplificar secuencias de RNA si el primer ciclo de PCR usa transcriptasa inversa, un enzima que funciona como la DNA polimerasa (véase la Fig. 8-33), pero que utiliza RNA como molde (Fig. 9-12). Una vez obtenida la cadena de DNA a partir del molde de RNA, el resto de los ciclos puede llevarse a cabo con DNA polimerasas, mediante protocolos estándar. La **PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR)** puede usarse, por ejemplo, para detectar secuencias derivadas de células vivas (que están transcribiendo su DNA en RNA) en lugar de tejidos muertos.

Se dispone de protocolos cuantitativos para estimar el número relativo de copias de una secuencia determinada en una muestra. El método se denomina **PCR cuantitativa**, o **qPCR**. Si una determinada secuencia de DNA está presente en una muestra en cantidades superiores a las normales –por ejemplo, si ciertos genes están amplificados en células tumorales- la qPCR puede poner de manifiesto el aumento de la representación de estas secuencias. En resumen, la PCR se realiza en presencia de una sonda que emite una señal fluorescente cuando está presente el producto de la PCR **(Fig. 9-13)**. Si la secuencia estudiada es más abundante que otras secuencias de la muestra, la señal de PCR alcanzará un umbral predeterminado más rápidamente. La PCR de transcriptasa inversa y la **PCR a tiempo real** pueden combinarse para determinar las concentraciones relativas de una determinada molécula de RNA en una célula en diferentes condiciones ambientales.

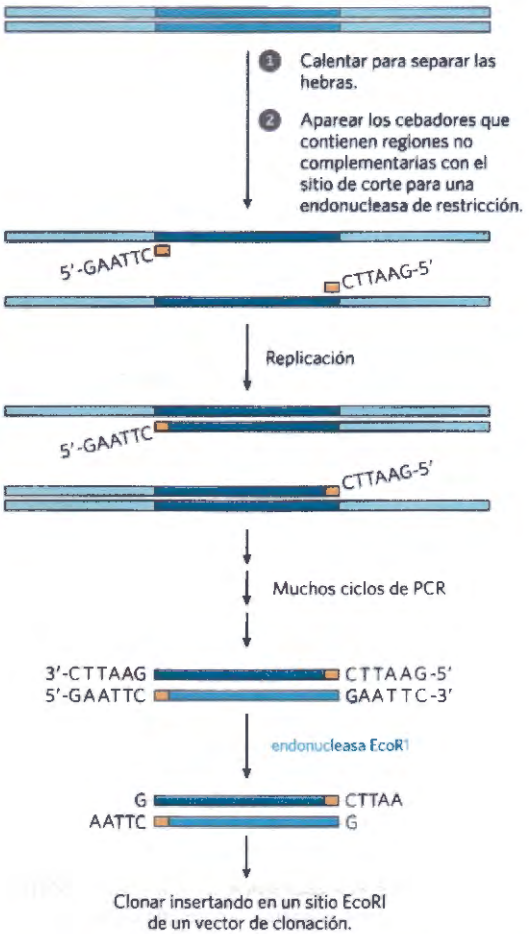


FIGURA 9-12 Clonación de un segmento de DNA amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El DNA amplificado con la reacción en cadena de la polimerasa se puede clonar (Véase la Fig. 8. 33) Los cebadores pueden incorporar extremos no complementarios que contengan un sitio de corte para una endonucleasa de restricción. Aunque estas partes de los cebadores no hibriden con el DNA, el procedimiento de la PCR los incorpora en el DNA amplificado. El corte de los fragmentos amplificados en estos sitios crea extremos cohesivos que facilitan la ligación del DNA amplificado en un vector de clonación.

RESUMEN 9.1 El estudio de los genes y sus productos

- La clonación de DNA y la ingeniería genética requieren el corte del DNA y la unión de segmentos de DNA en nuevas combinaciones: DNA recombinante.
- La clonación incluye el corte del DNA en fragmentos mediante enzimas, la selección y posible modificación del fragmento deseado, la inserción del fragmento de DNA en un vector de clonación adecuado, la transferencia del vector con el inserto de DNA a una célula huésped para su replicación y la selección de las células que contengan el fragmento de DNA.

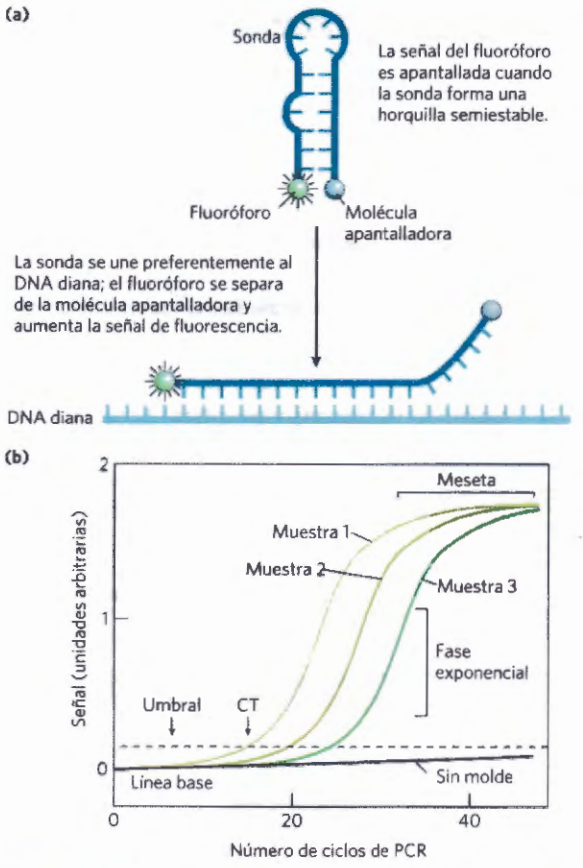


FIGURA 9-13 PCR cuantitativa La PCR puede llevarse a cabo de manera cuantitativa, mediante el seguimiento cuidadoso del progreso de la amplificación por PCR y determinando en que momento un segmento de DNA se ha amplificado hasta un determinado valor umbral. **(a)** La cantidad de producto de la PCR presente se determina midiendo el nivel de una sonda fluorescente unida a un oligonucleótido de referencia complementario del segmento de DNA que se está amplificando. La fluorescencia de la sonda no se detecta inicialmente debido a un extintor de la fluorescencia unido al mismo oligonucleótido. Cuando el oligonucleótido de referencia se aparea con su complementario en una copia del segmento de DNA amplificado, el fluoróforo se separa del grupo extintor y se emite fluorescencia. **(b)** A medida que avanza la reacción de PCR, la cantidad de segmento de DNA diana aumenta exponencialmente. La señal de fluorescencia también aumenta exponencialmente, a medida que las sondas oligonucletídicas se aparean con los segmentos amplificados. Después de muchos ciclos de PCR, la señal llega a una meseta, a consecuencia del agotamiento de uno o más componentes de la reacción. Cuando un segmento es más abundante en una muestra que en otra, la amplificación alcanza antes un determinado umbral. La línea "sin molde" presenta un lento incremento, y corresponde a la señal basal observada en un control que no incluye DNA añadido. CT corresponde al número de ciclos para que se supere el umbral por primera vez.

- Las endonucleasas de restricción (especialmente los enzimas de tipo II) y la DNA ligasa son enzimas esenciales en la clonación de genes.
- Los vectores de clonación consisten en plásmidos, y para los insertos de DNA más largos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y cromosomas artificiales de levadura (YAC).
- Las técnicas de ingeniería genética permiten manipular las células para que expresen y/o modifiquen los genes clonados.
- Se pueden unir proteínas o péptidos a una proteína de interés alterando su gen clonado para crear una proteína de fusión. Los segmentos proteicos adicionales pueden usarse para detectar la proteína o para purificarla mediante métodos apropiados de cromatografía de afinidad.
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de fragmentos elegidos de DNA o RNA para el clonaje y puede adaptarse para determinar el número de copias de un gen o para el seguimiento cuantitativo de la expresión génica.

9.2 Métodos basados en el DNA para estudiar la función de las proteínas

La función de las proteínas puede describirse a tres niveles. La **función fenotípica** describe los efectos de una proteína en el organismo entero. Por ejemplo, la pérdida de la proteína puede resultar en un crecimiento más lento del organismo, alteraciones del desarrollo e incluso la muerte. La **función celular** es una descripción de la red de interacciones de una proteína a nivel celular. La identificación de las interacciones con otras proteínas en la célula puede ayudar a definir los tipos de procesos metabólicos en los que participa la proteína. Finalmente, la **función molecular** hace referencia a la actividad bioquímica concreta de una proteína, incluyendo detalles tales como las reacciones catalizadas por un enzima o los ligandos unidos por un receptor. El desafío que representa el conocimiento de las funciones de miles de proteínas poco o nada caracterizadas que se encuentran en una célula típica ha dado lugar a una amplia variedad de técnicas. Los métodos basados en el DNA contribuyen de forma determinante a este esfuerzo y pueden suministrar información sobre los tres niveles. Con estas técnicas es posible determinar cuando se expresa una determinada proteína, las proteínas con que puede estar relacionada, su localización en la célula, la interacción con otros componentes celulares y los efectos sobre la célula cuando falta la proteína.

Las bibliotecas genómicas proporcionan catálogos especializados de información genética

Una **genoteca de DNA** es una colección de clones de DNA reunidos con objeto de disponer de una fuente de DNA para secuenciar, descubrir nuevos genes o para estudios de la función génica o proteica. Hay distintos tipos de genotecas según el origen del DNA y la función última de la genoteca.

Las más extensas son las **genotecas genómicas**, producidas cuando el genoma completo de un organismo determinado se corta en millares de fragmentos. Todos los fragmentos son clonados por inserción de cada fragmento en un vector de clonación. Ello crea una mezcla compleja de vectores recombinantes, cada uno con un fragmento clonado diferente. El primer paso en la preparación de una biblioteca genómica es la digestión *parcial* del DNA con endonucleasas de restricción, de forma que cualquier secuencia se encontrará en fragmentos de una gama limitada de tamaños, gama compatible con el vector de clonación para asegurar que prácticamente todas las secuencias estén representadas

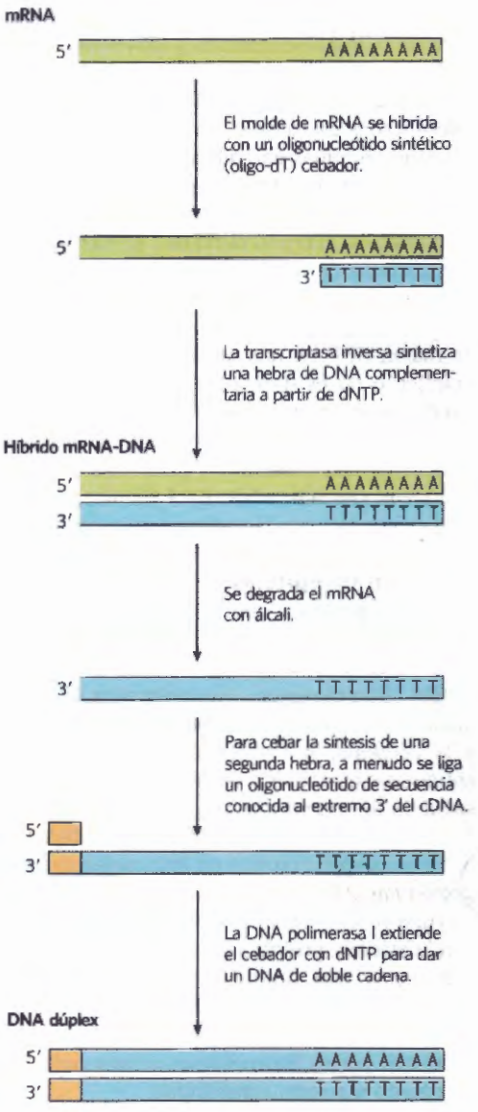


FIGURA 9-14 Construcción de una genoteca de cDNA a partir de mRNA. El mRNA total de una célula contiene los transcritos de miles de genes, y los cDNA generados a partir de este mRNA son, en consecuencia, heterogéneos. La transcriptasa inversa puede sintetizar DNA sobre un molde de DNA o de RNA (véase la Fig. 26-32). Para cebar la síntesis de una segunda hebra de DNA se ligan oligonucleótidos de secuencia conocida al extremo 3′ de la primera hebra, y el DNA de doble cadena obtenido de este modo se clona en un plásmido.

en los clones de la genoteca. Los fragmentos demasiado grandes o demasiado pequeños para la clonación se eliminan por centrifugación o electroforesis. El vector de clonación, tal como un BAC o YAC, se corta con la misma endonucleasa de restricción usada para digerir el DNA y se liga con los fragmentos de DNA genómico. La mezcla de DNA ligado se usa a continuación para transformar células bacterianas o de levadura para preparar un conjunto de células, cada una de las cuales aloja una molécula de DNA recombinante distinta. Idealmente, todo el DNA del genoma estudiado estará representado en la genoteca. Cada célula bacteriana o de levadura transformada forma una colonia, o "clon" de células idénticas, cada una con el mismo plásmido recombinante, uno de los muchos contenidos en el conjunto de la genoteca.

Los estudios dirigidos a definir la función génica o proteica a menudo recurren a genotecas más especializadas. Por ejemplo, una genoteca que contenga solamente los genes que se *expresan*, es decir, que se transcriben en RNA en un organismo dado o incluso en ciertas células o tejidos. Una genoteca de este tipo carece de las secuencias de DNA no codificantes que constituyen una gran parte de muchos genomas eucarióticos. En primer lugar, se extrae el mRNA de un organismo o de determinadas células del organismo, y se sintetizan **DNA complementarios (cDNA).** Esta reacción en múltiples pasos mostrada en la **Figura 9-14** se basa en la transcriptasa inversa que sintetiza DNA a partir del RNA. Los fragmentos de DNA de doble hebra resultantes se insertan en un vector adecuado y se clonan, generándose una población de clones denominada **genoteca de cDNA**. La detección de un gen de una proteína determinada en una genoteca de este tipo implica que éste se expresa en las células en las condiciones usadas para preparar la genoteca.

Las relaciones entre las secuencias o las estructuras suministran información sobre la función de las proteínas

Una razón importante para secuenciar numerosos genomas es construir un banco de datos que sirva para atribuir funciones a los genes a partir de la comparación de los genomas, práctica conocida como **genómica comparada.** A veces, un gen recién descubierto puede relacionarse por homología de secuencia con un gen estudiado previamente en otra o en la misma especie, y su función puede ser definida totalmente, o en parte, por esta relación. Los genes de diferentes especies, pero con una clara relación de secuencia y función se denominan **ortólogos**. Los genes relacionados de forma similar entre sí, pero pertenecientes a la misma especie, se denominan **parálogos**. Introdujimos estos términos en el Capítulo 3 en el contexto de las proteínas. Si se ha caracterizado la función de un gen en una especie, esta información puede usarse para asignar, al menos tentativamente, la función del ortólogo encontrado en una segunda especie. La correlación es más fácil de establecer cuando se comparan genomas de especies relativamente próximas, como el ratón y los humanos, aunque muchos genes claramente ortólogos se han identificado en especies tan lejanas como las bacterias y los humanos. A veces, incluso el orden de los genes en un cromosoma está conservado en largos segmentos del genoma de especies próximas **(Fig. 9-15)**. La conservación del orden de los genes, denominada **sintenia**, es un argumento adicional a favor de una relación ortóloga entre genes localizados en los mismos lugares de segmentos relacionados.

Alternativamente, ciertas secuencias asociadas con determinados motivos estructurales (Capítulo 4) pueden identificarse en una proteína. La presencia de un motivo estructural puede ayudar a definir la función molecular de una proteína sugiriendo que, por ejemplo, cataliza la hidrólisis del ATP, se une al DNA o forma un complejo con iones de zinc. Estas relaciones se establecen con ayuda de programas de ordenador cada vez más sofisticados, limitados solamente por la información

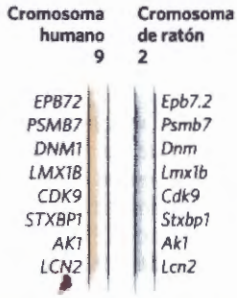


FIGURA 9-15 Sintenia en los genomas de ratón y humanos. Grandes segmentos de los dos genomas tienen genes relacionados alineados en el mismo orden en los cromosomas. En estos cortos segmentos del cromosoma 9 humano y del cromosoma 2 de ratón, los genes muestran un elevado grado de homología y el mismo orden. Los diferentes formatos de las letras de los nombres de los genes responden a las diferentes convenciones de la nomenclatura en los dos organismos. [Fuente: T.G. Wolsberg et al., *Nature* 409:824, 2001, Fig.1.]

disponible sobre la estructura de los genes y las proteínas y por nuestra capacidad para asociar las secuencias con los distintos motivos estructurales. Las secuencias del sitio activo de un enzima muy conservado en la evolución están típicamente asociadas con la función catalítica y su identificación es a menudo una etapa importante en el establecimiento del mecanismo de reacción de un enzima. El mecanismo de reacción, a su vez, suministra la información necesaria para desarrollar nuevos inhibidores del enzima con valor farmacológico.

Las proteínas de fusión y la inmunofluorescencia pueden localizar proteínas en las células.

A menudo, una indicación importante de la función de un producto génico procede de la determinación de su localización en la célula. Por ejemplo, una proteína encontrada exclusivamente en el núcleo podría estar implicada en procesos exclusivos de este orgánulo, tales como la transcripción, la replicación o la condensación de los cromosomas. A menudo se preparan proteínas de fusión con el propósito de localizar una proteína en una célula o en un organismo. Algunas de las fusiones más eficaces consisten en la unión de proteínas marcadoras que hacen posible la localización por visualización directa o por inmunofluorescencia.

Un marcador especialmente útil es la **proteína fluorescente verde (GFP)** **(Fig. 9-16)**. Un gen diana (que codifica la proteína estudiada) empalmado con el gen GFP genera una proteína de fusión altamente fluorescente que, literalmente, se ilumina cuando se expone a la luz azul y que puede localizarse directamente en una célula viva. La GFP procede de la medusa *Aequorea victoria*. La proteína tiene una estructura en barril β, y el fluoróforo (el componente fluorescente de la proteína) se encuentra en el centro del barril. El fluoróforo procede de la reorganización y oxidación de varios aminoácidos en una reacción autocatalítica que no requiere otras proteínas o cofactores aparte del oxígeno molecular (véase el Recuadro 12-3, Fig. 3). La GFP se clona fácilmente en forma activa en prácticamente cualquier célula. Con el microscopio se pueden observar unas pocas moléculas de esta proteína, lo que permite el estudio de su localización y movimientos en la célula. Mediante modificación cuidadosa de la proteína junto con aislamiento de proteínas fluorescentes de otros celenterados marinos se ha generado una amplia gama de estas proteínas con diferentes colores (Fig. 9-16b) y otras propiedades (brillantez, estabilidad). Por ejemplo, con esta tecnología la proteína GLR1 (un receptor del glutamato en el tejido nervioso) se ha visualizado como una proteína de fusión GLR1-GFP en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fig. 9-16c).

En muchos casos, la visualización de una proteína de fusión GFP en una célula viva no es posible, no es práctica o no es deseable. La proteína de fusión GFP puede ser inactiva o puede no expresarse lo suficiente para ser visualizada. En este caso, la **inmunofluorescencia** es una alternativa para visualizar la proteína endógena (no alterada). Está técnica requiere la fijación (y por lo tanto la muerte) de la célula. La proteína estudiada a veces se expresa como una proteína de fusión con un **epítopo de identificación**, una corta secuencia proteica que interacciona fuertemente con un anticuerpo bien caracterizado, comercialmente disponible. El anticuerpo tiene unidas moléculas fluorescentes (fluorocromos). Normalmente, la proteína estudiada no está alterada. Un anticuerpo específico se une a la proteína. A continuación se añade un segundo anticuerpo que se une específicamente al primero. Es el segundo anticuerpo el que lleva unido el fluorocromo (s) **(Fig. 9-17a)**. Una variante de esta técnica indirecta de visualización consiste en unir moléculas de biotina al primer anticuerpo y a continuación añadir estreptavidina (una proteína bacteriana estrechamente relacionada con la avidina, proteína que se une a la biotina; véase la Tabla 5-1) con fluorocromos unidos. La interacción entre la biotina y la estreptavidina se encuentra entre las más fuertes y específicas conocidas, y la posibilidad de añadir varios fluorocromos a cada proteína confiere al método una gran sensibilidad.

Se pueden preparar genotecas de cDNA altamente especializadas (Fig. 9-14) clonando cDNA o fragmentos de cDNA en un vector que acople cada secuencia de cDNA con una secuencia marcadora denominada gen identificador. Los genes acoplados se denominan a menudo construcción etiquetada. Por ejemplo, todos los genes de la genoteca pueden estar acoplados al gen GFP **(Fig. 9-18)**. Cada célula de la genoteca expresa uno de estos genes acoplados. La localización celular del producto de cualquier gen representado en la genoteca se manifestará como una zona iluminada en las



Osamu Shimomura [Fuente: Josh Reynolds/AP Images.]



Martin Chalfie [Fuente: Diane Bondareff/AP Images.]



Roger Y. Tsien [Fuente: HO/ Reuters/Corbis.]

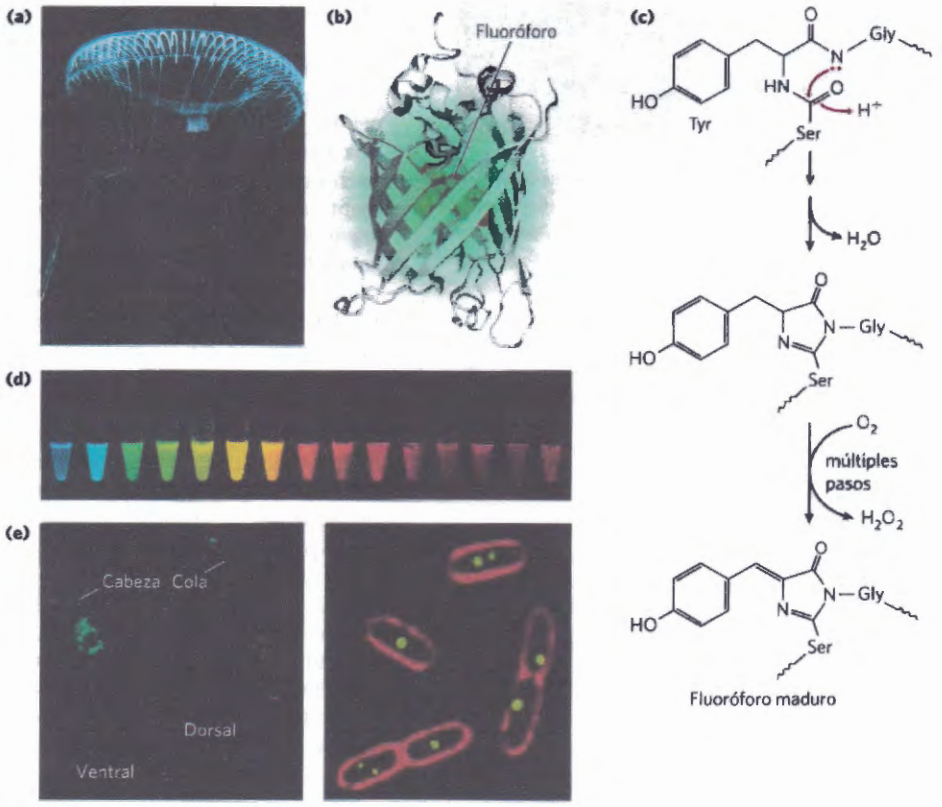


FIGURA 9-16 La proteína verde fluorescente (GFP). **(a)** La proteína GFP (PDB ID 1GFL), procedente de la medusa *Aequorea victoria*, es abundante en Puget Sound, Washington. **(b)** La proteína tiene una estructura en barril-β; el fluoróforo (mostrado con el modelo espacial) se encuentra en el centro del barril. **(c)** El fluoróforo de la GPF se deriva de una secuencia de tres aminoácidos, -Ser^{65}-Tyr^{66}-Ser^{67}-. El fluoróforo adquiere su forma madura a través de reordenamientos internos, acoplados a una reacción de oxidación múltiple, cuyo mecanismo simplificado se muestra en la figura. **(d)** En la actualidad se dispone de variantes de la GFP de prácticamente cualquier color del espectro visible. **(e)** La proteína de fusión GLR1-GFP emite una fluorescencia verde brillante en *Caenorhabditis elegans*, un gusano nemátodo (izquierda). GLR1 es un receptor del glutamato en el sistema nervioso. (Las gotas de lípido autoflorescentes se han coloreado arbitrariamente en magenta.) Las membranas de las células de *E.coli* (derecha) se han teñido con un colorante fluorescente rojo. Las células expresan una proteína que se une a un plásmido residente fusionado con GFP. Las manchas verdes indican la localización de los plásmidos. [Fuentes: (a) Chris Parks/ImageQuest Marine (b)PDB ID1GFL, F. Yang et a. *Nature Biotechnol.* 14:1246, 1996. (c, d) Cortesía de Roger Tsien, University of California, San Diego, Department of Pharmacology and Paul Steinbach. (e) (izquierda) Cortesía de Penelope J. Brockie and Andres V. Maricq, Department of Biology, University of Utha; (derecha) cortesía de A. Pogliano ° (2001), Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4486-4491.]

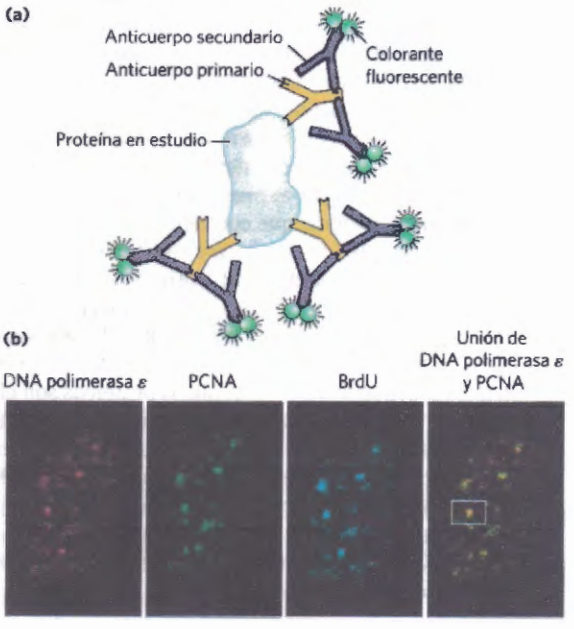


FIGURA 9-17 Inmunofluorescencia indirecta. **(a)** El anticuerpo primario se une a la proteína estudiada y se añade un anticuerpo secundario; este segundo anticuerpo, con uno o más grupos fluorescentes unidos, se une al primero. Se pueden unir varios anticuerpos secundarios al anticuerpo primario con la consiguiente amplificación de la señal. Si la proteína estudiada se encuentra en el interior de la célula, la célula se fija y se permeabiliza, y los dos anticuerpos se añaden uno tras otro. **(b)** El resultado final es una imagen en la cual las manchas brillantes indican la localización de la proteína o proteínas estudiadas en la célula. Las imágenes muestran un núcleo de un fibroblasto humano, teñido sucesivamente con anticuerpos y marcadores fluorescentes de la DNA polimerasa ε, de la PCNA, una importante proteína accesoria de la polimerasa, y de la bromo-desoxiuridina (BrdU), un análogo de los nucleótidos. El BrdU, añadido en un breve pulso, identifica las regiones donde el DNA se replica activamente. Los patrones de tinción muestran la colocalización de la DNA polimerasa ε y la PCNA en la regiones donde se sintetiza activamente el DNA. Se puede observar una de estas regiones en el recuadro blanco.
[Fuente: (b) Fuss, J. and Linn, S., 2002, "Human DNA polymerase ε colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase, " *J. Biol Chem.* 227:8658-8666 Cortesía de Jill Fuss, University of California, Berkeley.]

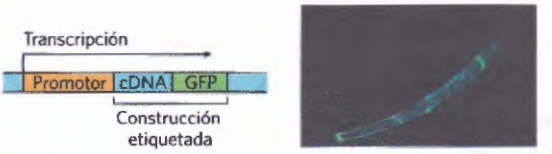


FIGURA 9-18 Genotecas de DNA especializadas. (a) La clonación de un cDNA vecino al gen de la proteína fluorescente verde (GFP) crea una construcción etiquetada. La transcripción avanza a lo largo del gen estudiado (el cDNA insertado) y del gen marcador (en este caso, GFP) y el transcrito de mRNA se expresa como una proteína de fusión. La parte de la proteína correspondiente a la GFP es visible en el microscopio de fluorescencia. Aunque sólo se muestra un ejemplo, son millares los genes que se pueden unir a GFP en construcciones similares y almacenar en genotecas en las que cada célula u organismo de la genoteca expresa una proteína diferente unida a GFP. Si la proteína de fusión se expresa correctamente, es posible determinar su localización en la célula o en el organismo. La fotografía muestra un gusano nemátodo que contiene una proteína de fusión con GFP que sólo se expresa en las cuatro neuronas del "tacto" que se encuentran a lo largo del cuerpo. [Fuente: Cortesía de Kevin Strange, PhD, and Michael Christensen, PhD, Department of Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center.]

células que expresen el gen de fusión apropiado a un nivel suficiente, suponiendo que el gen conserve su función y localización normales. Muchas

Las interacciones proteína-proteína pueden contribuir a determinar la función de las proteínas

La determinación de las interacciones de una proteína es clave para definir sus funciones. En el caso de las interacciones proteína-proteína, la asociación de una proteína de función desconocida con otra de función conocida puede sugerir por asociación cuál pueda ser la función desconocida. Las técnicas utilizadas en estas investigaciones son muy variadas.

Purificación de complejos proteicos Empleando genotecas de cDNA en las que cada gen está fusionado a un epítopo de identificación, es posible precipitar el producto proteico de un gen usando el anticuerpo que se une al epítopo, proceso denominado **inmunoprecipitación (Fig. 9-19)**. Si la proteína marcada se expresa en las células, otras proteínas que se unan a ella también precipitarán. La identificación de las proteínas asociadas puede poner de manifiesto algunas de las interacciones proteína-proteína de la proteína marcada. Hay muchas variantes de este procedimiento. Por ejemplo, un extracto celular crudo que expresa una proteína marcada se añade a una columna que contiene el anticuerpo inmovilizado (véase la Fig. 3-17c para una descripción de la cromatografía de afinidad). La proteína marcada se une al anticuerpo y las proteínas que interaccionan con ella a veces también son retenidas por la columna. La conexión entre la proteína y el identificador se corta con una proteasa específica y los complejos proteicos son eluídos de la columna y analizados. Estos métodos pueden utilizarse para estudiar las complejas redes de interacciones en una célula. En principio, la metodología cromatográfica para analizar interacciones proteína-proteína puede utilizarse con cualquier tipo de etiqueta proteica (marca de His, GST, etc.) que pueda ser inmovilizada sobre un soporte cromatográfico adecuado.

La selectividad de este método ha mejorado con el uso de **etiquetas de purificación por afinidad en tándem (TAP).** Se unen a la proteína dos etiquetas consecutivas y la proteína de fusión se expresa en una célula **(Fig. 9-20)**. La primera etiqueta es la proteína A, una proteína que se encuentra en la superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus* que se une fuertemente a la inmunoglobulina G (IgG) de mamíferos. La segunda etiqueta es, a menudo, un péptido de unión a calmodulina. Se hace pasar un extracto crudo que contiene la proteína de fusión doblemente etiquetada (TAP) a través de una columna que contenga un medio cromatográfico con los anticuerpos IgG que se unen a la proteína A inmovilizados. La mayoría de proteínas celulares que no se unan pasarán a través de la columna sin ser retenidas, pero las proteínas que normalmente interaccionan con la proteína examinada en la célula serán retenidas. A continuación, se corta la primera etiqueta de la proteína de fusión con una proteasa muy específica, la proteasa TEV, y la proteína de fusión diana acortada, junto con cualquier proteína que interaccione no covalentemente con la proteína examinada, será eluída de la columna. El eluyente se hace pasar a través de una segunda columna que contiene una matriz con calmodulina unida que se une a la segunda etiqueta. Al igual que antes, las proteínas débilmente unidas pasan a través de la columna sin ser retenidas. Después de cortar

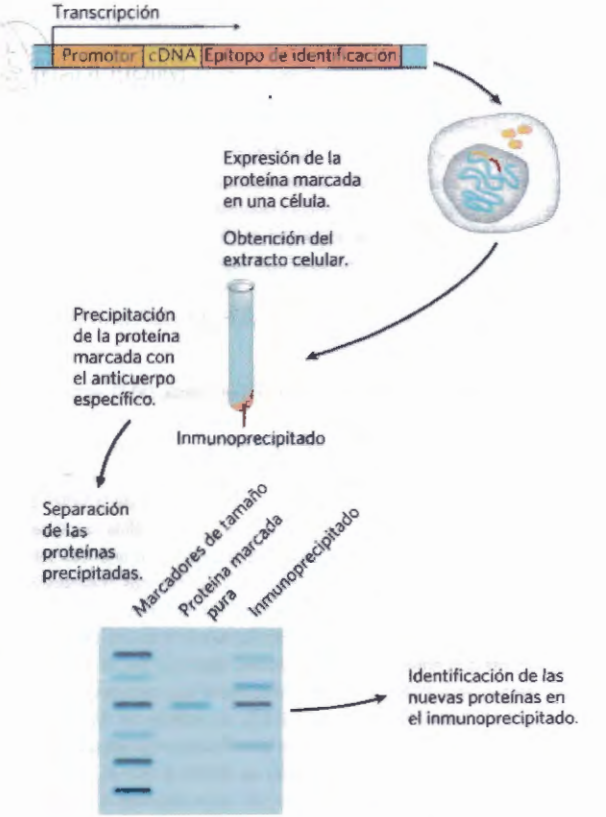


FIGURA 9-19 Uso de epítopos de identificación para estudiar interacciones proteína-proteína. El gen estudiado se clona al lado del gen de un epítopo de identificación, y la proteína de fusión resultante se precipita con anticuerpos contra el epítopo. Cualquier otra proteína que interaccione con la proteína etiquetada también precipitará, lo que ayuda a elucidar interacciones proteína-proteína.

la segunda etiqueta, la proteína objeto de estudio se eluye junto con sus proteínas asociadas. Los dos pasos consecutivos de purificación eliminan cualquier contaminante débilmente unido, minimizándose los falsos positivos. Las interacciones entre proteínas que persistan después de los dos pasos de purificación es probable que sean funcionalmente significativas.

Análisis del doble híbrido en levadura Un elaborado método genético para definir interacciones proteína-proteína se basa en las propiedades de la proteína Gal4 (Gal4p; véase la Fig. 28-31), que activa la transcripción de los genes *GAL* de levadura (genes que codifican los enzimas del metabolismo de la galactosa). Gal4p tiene dos dominios: uno que se une a una secuencia de DNA específica y otro que activa la RNA polimerasa que sintetiza mRNA de un gen adyacente. Los dos dominios de Gal4p son estables por separado, pero la activación de la RNA polimerasa requiere la interacción con el dominio de activación que, a su vez, requiere un correcto posicionamiento a cargo del dominio de unión al DNA. Por lo tanto, los dominios deben estar juntos para funcionar correctamente.

En al **análisis del doble híbrido en levadura**, las regiones que codifican proteína de los genes analizados se ligan con la región codificante del dominio de unión a DNA o con el dominio de activación de Gal4p, de forma que los genes resultantes expresan una serie de proteínas de fusión **(Fig. 9-21)**. Si una proteína unida al dominio de unión al DNA interacciona con una proteína unida al dominio de activación, se activa la transcripción. El gen marcador transcrito como resultado de esta activación generalmente codifica una proteína necesaria para

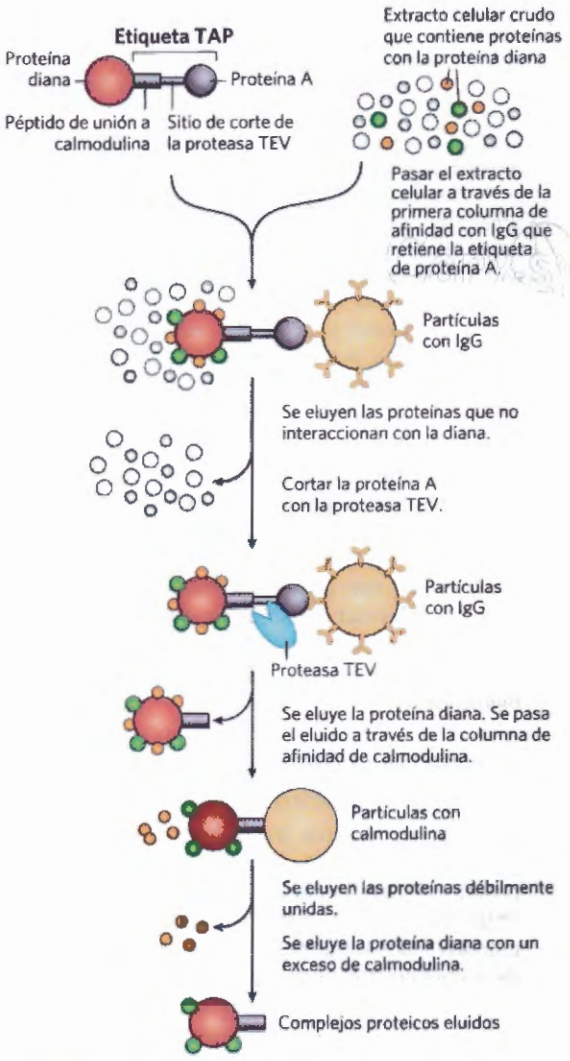


FIGURA 9-20 Etiquetas para la purificación por afinidad en tándem (TAP). Una proteína etiquetada para TAP y las proteínas asociadas se aíslan mediante dos purificaciones por afinidad consecutivas, tal como se describe en el texto.

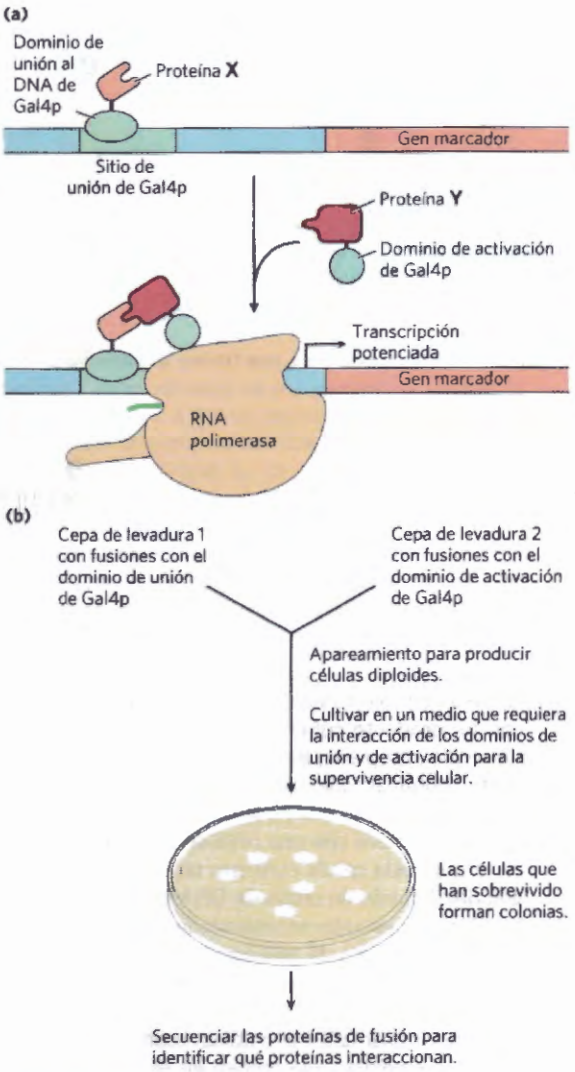


FIGURA 9-21 Análisis del doble híbrido en levadura. (a) El objetivo es aproximar el dominio de unión a DNA y el dominio de activación de la proteína Gal4 de levadura (Gal4p) a través de la interacción de dos proteínas, X e Y, con las cuales está fusionado uno u otro dominio. Esta interacción está acompañada de la expresión de un gen marcador. **(b)** Las dos fusiones génicas se localizan en cepas separadas de levadura, que después son apareadas. La mezcla apareada se cultiva en un medio que no permita la supervivencia de la levadura a menos que se exprese el gen marcador. De este modo, todas las colonias supervivientes contienen parejas de proteínas que interaccionan. La secuenciación de las proteínas de fusión en las células supervivientes revela cuales son las proteínas que interaccionan.

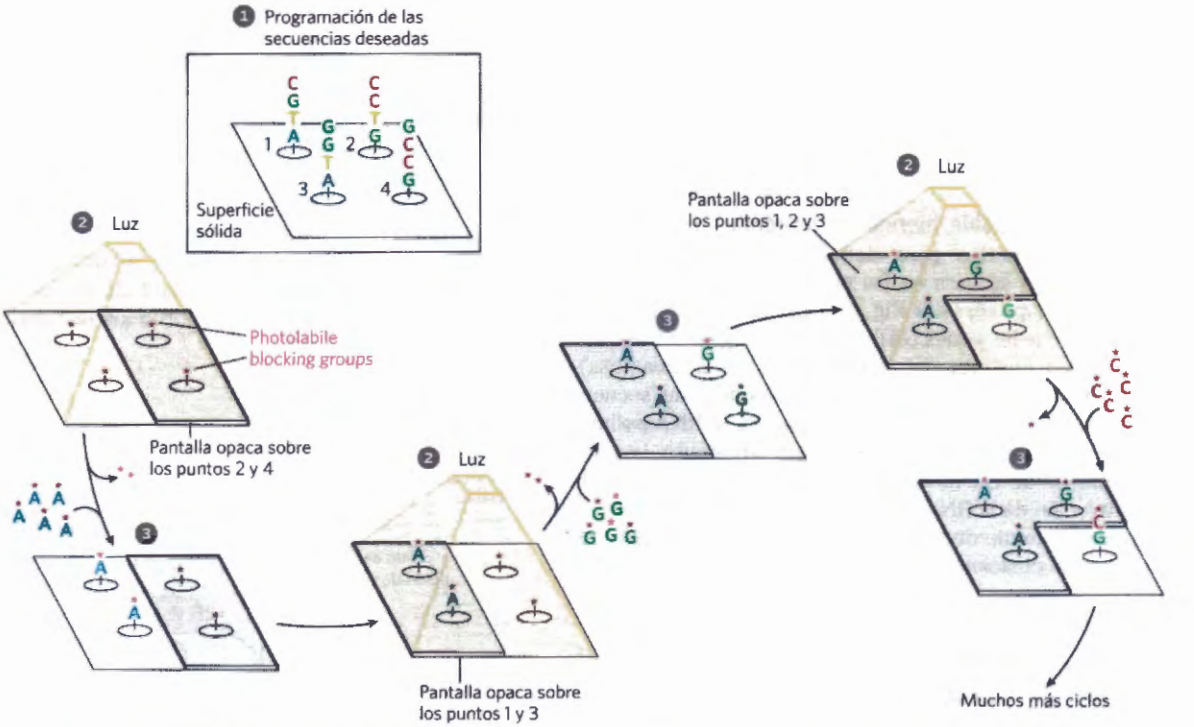


FIGURA 9-22 Fotolitografía para fabricar un microchip de DNA. ❶ Se programa un ordenador con las secuencias de los oligonucleótidos deseados. Los grupos reactivos, unidos a una superficie sólida, se encuentran inicialmente inactivados por grupos de bloqueo fotoactivables, que pueden eliminarse con un destello de luz. ❷ Una pantalla opaca protege de la luz determinados áreas o "puntos" de la superficie, evitando su activación, mientras que otros puntos están expuestos. ❸ La superficie se lava con una disolución que contiene un tipo de nucleótido activado (por ej. A*). Se bloquea el grupo 5'-hidroxilo del nucleótido para evitar reacciones no deseadas y el nucleótido queda unido a los grupos de la superficie en los puntos apropiados a través del grupo 3'-hidroxilo. La superficie se lava sucesivamente con disoluciones que contienen cada uno de los tipos restantes de nucleótido activado (G*, C*, T*). Los grupos de bloqueo en 5' de cada nucleótido limitan las reacciones a la adición de un nucleótido a la vez, y estos grupos también pueden eliminarse con luz. Una vez que se ha unido un nucleótido a cada punto se puede añadir un segundo nucleótido para extender el oligonucleótido naciente en cada punto, utilizando pantallas y luz que aseguren que se añaden los nucleótidos correctos a cada punto con la secuencia correcta. El proceso continúa hasta finalizar las secuencias deseadas sobre cada uno de los millares de puntos del microchip de DNA.

el crecimiento o es un enzima que cataliza una reacción con un producto coloreado. Por lo tanto, cultivadas en un medio apropiado, las células que contienen una pareja de proteínas que interaccionan se distinguen fácilmente de aquellas que no la contienen. Se puede preparar una genoteca con una cepa de levadura determinada en la que cada célula contiene un gen fusionado con el gen del dominio de unión de DNA de Gal4p; muchos de estos genes estarán representados en la genoteca. En una segunda cepa de levadura, el gen estudiado se une con el gen del dominio de activación de Gal4p. A continuación, las cepas de levadura se aparean y la células diploides individuales se cultivan hasta obtener colonias. Las únicas células que crecen en el medio selectivo, o que producen el color apropiado, son aquellas en las cuales el gen estudiado se aparea, permitiendo así la transcripción del gen marcador. Esto permite un escrutinio a gran escala de proteínas celulares que interaccionan con la proteína diana. La proteína que interacciona que está ligada al dominio de unión al DNA de Gal4p, presente en una determinada colonia puede ser fácilmente identificada por secuenciación del gen de la proteína de fusión. Pueden aparecer algunos falsos positivos, debido a la formación de complejos multiproteína.

Todas estas técnicas para determinar la localización celular y las interacciones moleculares suministran valiosa información sobre la función de las proteínas. Sin embargo, no pueden reemplazar a la bioquímica clásica. Simplemente, hacen posible una rápida incursión en nuevos problemas biológicos importantes. En combinación con las nuevas técnicas de bioquímica y biología molecular en rápida evolución, las técnicas aquí descritas están acelerando no sólo el descubrimiento de nuevas proteínas sino también de nuevos procesos y mecanismos biológicos.

Los microchips de DNA suministran información sobre los patrones de expresión de RNA y otros aspectos

Importantes mejoras en la tecnología básica de las genotecas de DNA, la PCR y la hibridación han hecho posible, conjuntamente, el desarrollo de los **microchips de DNA**, el escrutinio rápido y simultáneo de muchos miles de genes. Segmentos de DNA de genes de secuencia conocida, de unas pocas docenas a varios centenares de pares de bases de longitud, se amplifican por PCR y se fijan sobre una superficie sólida, mediante dispositivos automáticos que depositan con precisión algunos nanolitros de una disolución de DNA. Millares de gotas que contienen las secuencias procedentes de un gen particular son depositadas en un casillero prediseñado que mide sólo unos pocos centí-

metros cuadrados. Una estrategia alternativa que se usa cada vez con mayor frecuencia consiste en sintetizar el DNA directamente sobre la superficie sólida, mediante fotolitografía **(Fig. 9-22)**. El chip resultante puede incluir secuencias derivadas de cada gen de un genoma bacteriano o de levadura o familias seleccionadas de genes pertenecientes a genomas de mayor tamaño. Los microchips pueden usarse para examinar los mRNA o los cDNA de un determinado tipo celular o de un cultivo celular par identificar los genes que se expresan en esas células.

Un microchip de DNA puede servir para averiguar qué genes se expresan en un determinado estadio de desarrollo de un organismo o bajo un conjunto dado de condiciones ambientales. Por ejemplo, se aísla el mRNA total de células en dos estadios diferentes de desarrollo y se convierte en cDNA usando transcriptasa inversa. Pueden usarse desoxirribonucleótidos marcados con fluorescencia para que una de las muestras de cDNA emita fluorescencia roja y la otra verde **(Fig. 9-23)**. Se mezclan los cDNA de las dos muestras y se usan como sondas del microchip. Cada DNA se hibridará solamente con la zona del microchip que corresponda al gen que codifica el mRNA que dio lugar al cDNA.. Las manchas de fluorescencia verde representan los mRNA más abundantes en una fase del desarrollo; las de fluorescencia roja representan mRNA más abundantes en otras fases del desarrollo. Si un gen produce mRNA igualmente abundante en ambos estadios de desarrollo dan fluorescencia amarilla. El uso de una mezcla de dos muestras para medir la abundancia relativa de las secuencias en lugar de la abundancia absoluta corrige las diferencias en las cantidades de DNA depositadas originalmente en cada punto del casillero así como otras inconsistencias que puedan existir entre los diferentes puntos del microchip. Los puntos que emiten fluorescencia representan una especie de foto instantánea de todos los genes que se expresan en las células en el momento en que fueron recogidas y proporcionan una visión de la expresión génica a escala de la totalidad del genoma. En un gen de función desconocida, el momento y las circunstancias de su expresión pueden proporcionar pistas importantes acerca de su papel en la célula.

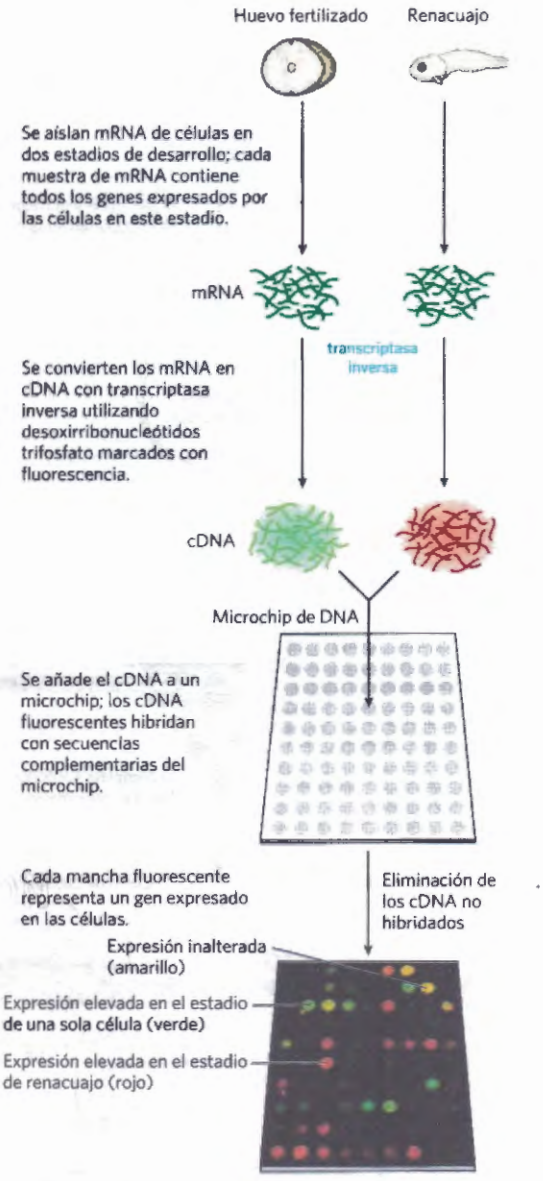
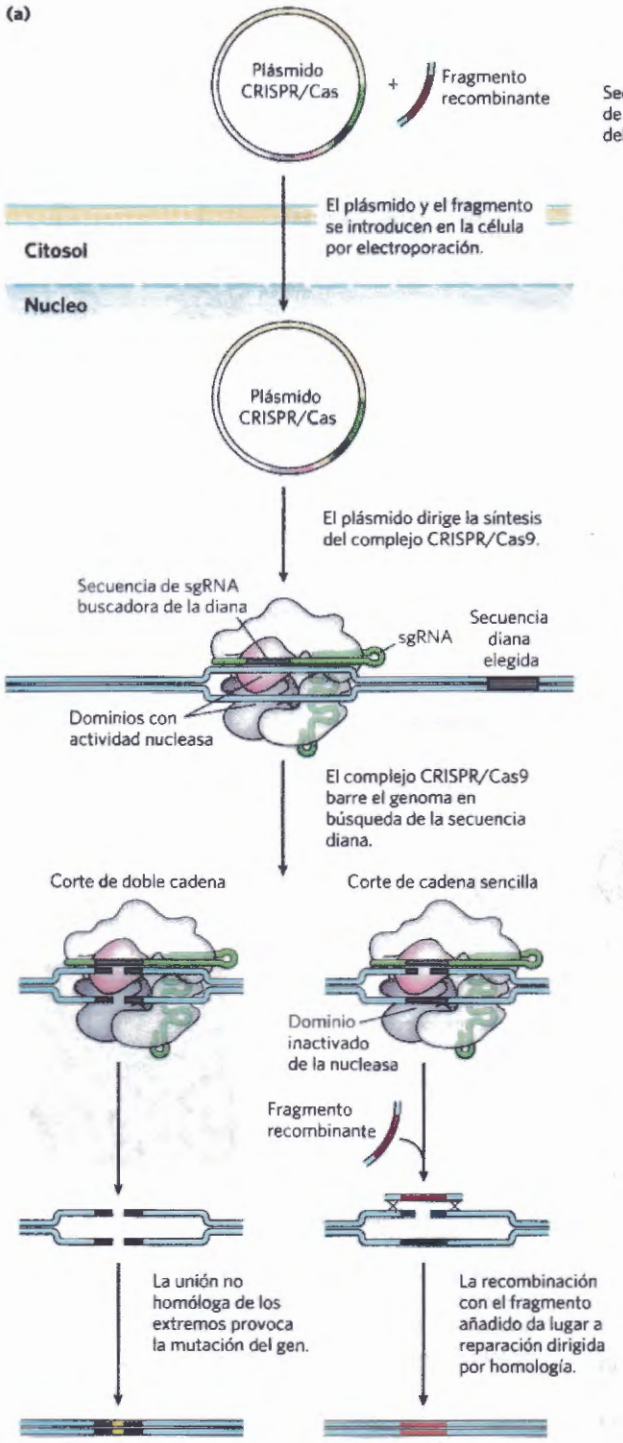


FIGURA 9-23 Experimento con un microchip de DNA. Un microchip puede prepararse a partir de cualquier secuencia de DNA conocida y de cualquier procedencia. Una vez se ha unido el DNA a un soporte sólido, el microchip puede usarse con otros ácidos nucleicos marcados con fluorescencia. En este caso, las muestras de mRNA provienen de células de una rana en dos estadios diferentes del desarrollo.

La inactivación o la alteración de un gen por CRISPR pueden revelar su función

Una de las maneras más eficaces para entender la función de un gen consiste en modificarlo (mutarlo) o en eliminarlo, para después examinar cómo la alteración genómica afecta el crecimiento celular o la función. Los métodos disponibles para modificar el genoma son cada vez más elaborados. Una estrategia muy utilizada consiste en introducir una nucleasa en el interior de una célula para generar un corte de doble cadena en un sitio funcionalmente crítico del gen elegido. En los eucariotas, este tipo de roturas son reparadas normalmente por sistemas celulares que inducen la unión de extremos no homólogos (NHEJ), tal como se describe en el Capítulo 25. NHEJ repara la rotura de doble cadena, pero el proceso es impreciso. La frecuente eliminación o incorporación de nucleótidos durante la reparación inactiva el gen. En las bacterias, las roturas de cadena doble normalmente se reparan con mayor precisión por los sistemas de recombinación homóloga (Capítulo 25), pero pueden aparecer mutaciones inactivandoras. Se diseñaron varias nucleasas que pueden unirse prácticamente a cualquier secuencia, pero el proceso era caro antes de la aparición de los **sistemas CRISPR/Cas** en 2011.

"CRISPR" es el acrónimo de repeticiones palíndrómicas cortas regularmente espaciadas; como su nombre indica, estas consisten en una serie de repeticiones regularmente espaciadas en el genoma bacteriano. La proteína Cas (asociada a CRISPR) es una nucleasa. Las secuencias CRISPR y la proteína Cas son componentes de un tipo de sistema inmunológico que evolucionó para hacer posible la supervivencia de las bacterias frente a



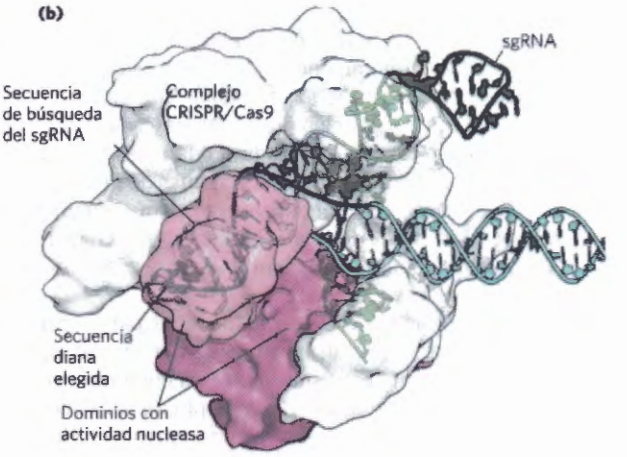


FIGURA 9-24 El sistema CRISPR/Cas9 para ingeniería genómica. (a) Los genes que codifican la proteína Cas9 y el sgRNA se introducen en la célula donde se proyecta realizar un cambio genómico dirigido. El sgRNA posee una región complementaria de la secuencia genómica elegida (púrpura), esta región puede ser manipulada para que contenga cualquier secuencia deseada. En la célula se forma un complejo de CRISPR sgRNA y proteína Cas9, que se une al sitio elegido en el DNA. La estructura del complejo se muestra en **(b)**. En la ruta de la izquierda en **(a)**, dos sitios con actividad nucleasa de Cas9 cortan separadamente cada hebra del DNA diana, produciendo un corte de doble cadena. El corte de doble cadena normalmente se repara mediante la unión de extremos no homóloga, que generalmente elimina o modifica los nucleótidos en el sitio de unión. Alternativamente, como se muestra en la ruta de la derecha, si se inactiva un sitio con actividad nucleasa, Cas9 crea una rotura de cadena sencilla en la secuencia diana. En presencia de un fragmento de DNA con funciones de dador en la recombinación, idéntico a la secuencia diana, pero incorporando el cambio de secuencia deseado (fragmento en rojo), la recombinación homóloga puede a veces cambiar en el sitio de la rotura para adaptarla a la del DNA dador. [Fuente: PDB ID 4UN3, C. Anders et al., *Nature* 513:569, 2014.]

las infecciones por bacteriófagos. Las secuencias CRISPR se encuentran en el genoma bacteriano rodeando secuencias derivadas de fagos que anteriormente infectaron a las bacterias sin matarlas. Las secuencias virales son, en efecto, las secuencias espaciadoras que separan las secuencias CRISPR. Cuando el mismo bacteriófago ataca de nuevo a la bacteria, portadora del correspondiente sistema CRISPR/Cas, la secuencia CRISPR y la proteína Cas actúan conjuntamente para destruir el DNA viral. Primero, las secuencias CRISPR se transcriben a RNA y las secuencias espaciadoras virales individuales son cortadas para formar productos denominados **RNA guía (gRNA)**, que incorporan una cierta cantidad del RNA repetitivo adyacente. Un gRNA forma un complejo con una o más proteínas Cas y en algunos casos con otro RNA, denominado **transactivador CRISPR RNA** o **tracrRNA**. El complejo resultante se une específicamente al DNA, cortándolo y destruyéndolo sirviéndose de la actividad nucleasa asociada a las proteínas Cas.

La tecnología actual se basa en el descubrimiento de un sistema CRISPR/Cas relativamente simple en *Streptococcus pyrogenes*, Este sistema requiere una sola proteína Cas para cortar el DNA. El trabajo en muchos laboratorios, en particular en el de Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, ha producido un sistema CRISPR/Cas9 simplificado compuesto por una sola proteína (Cas9) y de un RNA asociado, formado por gRNA y tracrRNA unidos para formar un **único RNA guía (sgRNA).** La secuencia guía se puede alterar para interaccionar con prácticamente cualquier secuencia genómica **(Fig. 9-24)**. Cas9 tiene dos dominios distintos con actividad nucleasa. : un dominio corta la hebra del DNA apareada con el sgRNA, y la otra corta la hebra de RNA opuesta. La inactivación de un dominio crea un enzima que corta solamente una hebra y que, por tanto, genera una rotura de cadena sencilla. El

sgRNA es necesario tanto para aparearse con la secuencia diana en el DNA como para activar los dominios con actividad nucleasa responsables del corte.

Los plásmidos que expresan la proteína requerida y los componentes de RNA de CRISPR/Cas pueden introducirse en las células por electroporación. En las células de numerosos organismos el gen diana es inactivado en entre el 10% y el 50% de las células tratadas. Si se necesita un cambio en el genoma (mutación) en lugar de una simple inactivación, es posible introducirlo por recombinación cuando un fragmento de DNA, conteniendo el sitio de corte y el cambio deseado se introduce en la célula con los plásmidos CRISPR/Cas. La recombinación es a menudo ineficiente, pero se puede mejorar introduciendo un corte de cadena sencilla en lugar de un corte de cadena doble en el sitio diana (Fig. 9-24).

Nuevas aplicaciones para el CRISPR/Cas van apareciendo rápidamente. Aunque los usos terapéuticos sean todavía lejanos, los desarrollos recientes sugieren su posible aplicación en el tratamiento de enfermedades genéticas, el HIV y otras muchas dolencias.

RESUMEN 9.2 Métodos basados en el DNA para comprender la función de las proteínas

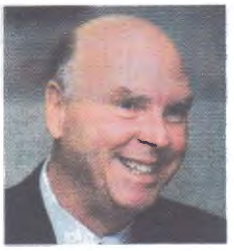
- Las proteínas pueden estudiarse a nivel fenotípico, celular o de función molecular.
- Las genotecas de DNA pueden ser el primer paso para muchos tipos de estudios sobre la función de las proteínas.
- La fusión del gen objeto de estudio con genes que codifican la proteína verde fluorescente o un epitopo de identificación puede permitir la visualización de la localización celular del producto génico, sea directamente o por inmunofluorescencia.
- Las interacciones de una proteína con otras proteínas o RNA puede estudiarse con epitopos de identificación e inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad. El análisis del doble híbrido en levadura pone de manifiesto las interacciones moleculares in vivo.
- Los microchips pueden revelar los patrones de expresión de los genes que cambian en función de los estímulos celulares, el estadio del desarrollo u otras condiciones
- El sistema CRISPR/Cas es una manera eficaz y económica para inactivar genes o alterar su secuencia con el propósito de investigar su función.

9.3. La genómica y la historia humana

La automatización del método de secuenciación original de Sanger produjo las primeras secuencias genómicas completas de especies bacterianas en la década de 1990. Dos secuencias completas del genoma humano fueron completadas en 2001. Una de ellas fue fruto de un proyecto público liderado primero por James Watson y más tarde por Francis Collins. Un proyecto paralelo de carácter privado fue liderado por Craig Venter. Estos logros fueron el resultado de un esfuerzo coordinado durante más de una década de docenas de laboratorios en todo el mundo, pero no fueron sino el principio de la que estaba por venir. Con las nuevas tecnologías de secuenciación (Capítulo 8), el tiempo requerido para secuenciar un genoma humano se ha reducido de años a días.



Francis S. Collins [Fuente: Alex Wong/ Getty Images.]



J. Craig Venter [Fuente: Shawn Thew/ Stringer/AFP/Getty Images.]

El genoma humano es una parte cada vez menor de las secuencias disponibles. Los genomas de millares de otras especies han sido secuenciados y puestos a pública disposición. Se dispone, pues, de un panorama de la complejidad genómica a través de los tres dominios de los organismos vivos: Bacteria, Arquea y Eukaria **(Fig. 9-25)**. Mientras que muchos de los proyectos de secuenciación iniciales correspondían a especies comúnmente utilizadas en los laboratorios de investigación, actualmente incluyen especies de interés práctico, médico, agrícola y evolutivo. Se han secuenciado genomas de todas las familias de bacterias conocidas. Las secuencias eucarióticas completadas se cuentan por millares. Se han secuenciado millares de genomas humanos individuales, y a medida que el número aumenta, la medicina personalizada basada en el genoma se va haciendo realidad (Recuadro 9-1). Se han secuenciado genomas de especies extintas como el *Homo neardenthalensis* y de humanos que vivieron en los milenios pasados. Cada secuencia genómica amplia las posibilidades dde análisis. Colectivamente, hacen posible comparaciones que ponen de manifiesto tanto los genes que son únicos de una especie o de un grupo de especies. Entre las muchas iniciativas en curso se encuentra el cartografiado de genes, la identificación de proteínas y genes relacionados con enfermedades, la identificación patrones genéticos de interés médico y trazar nuestra propia historia colectiva.

La anotación proporciona una descripción del genoma

Una secuencia genómica es una sucesión de residuos de A, G, T y C, que carece de sentido antes de ser interpretada. El proceso de **anotación del genoma** informa de la localización y función de los genes y otras secuencias críticas. La anotación genómica convierte la secuencia en información, que cualquier investigador puede usar libremente, y normalmente esta focalizada en el DNA genómico que abarca los genes que codifican RNA y proteína, el objetivo más común de la investigación. Cada nuevo genoma secuenciado contiene muchos genes, a menudo 40% o más del total, de los cuales se conoce poco o nada.

Mediante el uso de medios basados en la Web, que aplican capacidad de cálculo a la genómica comparada, es posible definir localizaciones genómicas y asignar

RECUADRO 9-1 MEDICINA Medicina genómica personalizada

Cuando los gemelos Noah y Alexis Beery nacieron en California mostraron síntomas que dieron lugar a un diagnóstico de parálisis cerebral. Los tratamientos no dieron resultados aparentes. Insatisfechos con el diagnóstico o con el tratamiento, los padres de los gemelos, Joe y Letta, llevaron a los gemelos, por aquel entonces de 5 años, a ver a un especialista de Michigan, que les diagnosticó una rara enfermedad genética denominada distonía con respuesta a DOPA. Se prescribió un tratamiento que suprimió los síntomas y permitió que los gemelos llevasen una vida normal. Sin embargo, a los 12 años, Alexis desarrolló un severo catarro y dificultades respiratorias que de nuevo pusieron en peligro su vida. En un episodio, el personal sanitario tuvo que reanimarlo dos veces. Los síntomas no parecían estar relacionados con la distonia. ¿Sería Noah el siguiente? Frustrados y profundamente preocupados, los padres de los gemelos solicitaron una secuencia genómica completa tanto de Noah como de Alexis. Esta iniciativa sin duda poco usual era natural en el caso de la familia Beery. Joe era el responsable de información de Life Technologies, desarrollador de las tecnologías de secuenciación utilizadas en muchos grandes centros de secuenciación. Los casos de Noah y Alexis fueron asumidos por Matthew Brainbridge y su equipo del Centro de Secuenciación del Genoma Humano en el Baylor College of Medicine en Houston, Tejas. Los resultados fueron decisivos. Los gemelos tenían mutaciones en sus genomas que producían no sólo una deficiencia de DOPA, sino también una deficiencia potencial en la producción de serotonina. Un pequeño ajuste de la terapia de Alexis acabó con los síntomas que ponían en peligro su vida, y la misma terapia se administró a su hermano. Ambos hermanos llevan ahora una vida normal.

El primer borrador del genoma humano se completó en 2001, después de 12 años, con un coste de 3.000 millones de dólares. El coste se ha desplomado (Fig. 1) desde entonces, y los nuevos genomas humanos completos ya no son una novedad. La meta de secuenciar un genoma humano por 1.000 dólares está en el horizonte y augura una amplia difusión de esta tecnología. Puesto que la mayoría de cambios que afectan a la salud humana se encuentran en las regiones que codifican proteínas (una suposición que es posible que se ponga en duda en los próximos años), una alternativa más barata es secuenciar simplemente el 1% del genoma que representa las regiones codificantes (exones) de los genes, el **exoma**.

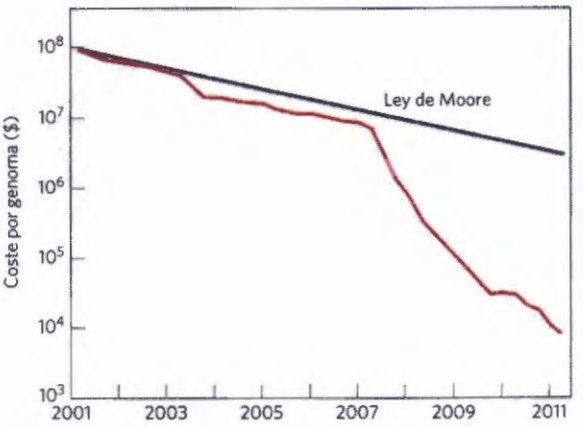


FIGURA 1 Desde enero de 2008 el coste de secuenciar el genoma humano ha disminuido mucho más rápidamente que el coste de procesar datos en ordenadores (ley de Moore). [Fuente: Data from the National Human Genome Research Institute.]

La primera secuencia del genoma humano procede de un genoma haploide, derivado de una mezcla de DNA de diferentes individuos. Esta secuencia fue completada en 2004 y se considera como la secuencia de referencia. Las siguientes secuencias genómicas humanas completas, muchas de genomas diploides individuales, han demostrado que existe una gran variación genética individual. En relación con la secuencia de referencia, un humano típico tiene alrededor de 3,5 millones de SNP (de los cuales un 60% son heterocigotos, presentes en sólo uno de los dos cromosomas) y unos pocos centenares de miles de diferencias, consistentes en pequeñas inserciones y deleciones y cambios en el número de copias de las repeticiones. Solamente una pequeña proporción (de 5.000 a 10.000) de los SNP afectan a las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes.

Estas complejidades hacen que, al menos a corto plazo, el diagnóstico correcto de una enfermedad basado en la secuenciación completa del genoma sea una excepción y no la regla. Sin embargo, pocas disciplinas avanzan con tanta rapidez como la genómica humana. El número de casos resueltos favorablemente aumenta rápidamente a medida que la tecnología se hace más fácilmente disponible y mejora la capacidad del análisis genómico para reconocer cambios causales.

tentativamente funciones génicas (si es posible) basadas en la similitud con genes estudiados en otros genomas. El clásico algoritmo BLAST (procedimiento básico de búsqueda basado en el alineamiento local) permite una rápida búsqueda de todas las bases de datos de las secuencias relacionadas con una de referencia y es especialmente útil para investigar la función de un gen en particular. El BLAST es uno de los muchos procedimientos disponibles en el sitio del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), gestionado por los Institutos Nacionales de la Salud y el sitio Ensemble cogestionado por el EMBL-EBI y el Instituto Wellcome Trust Sanger. Nuevos y más eficientes métodos de secuenciación de DNA han propiciado una explosión de

nuevas secuencias genómicas. Estas están almacenadas y pueden consultarse en varios bancos de datos de acceso público. Una buena iniciación a estas fuentes puede encontrarse en el sitio del Centro Nacional de Información biotecnológica (NCBI); www.ncbi.nlm.nih.gov), mantenido por los Institutos Nacionales de la salud y comantenido por el EMBL-EBI (Laboratorio Europeo de Biología Molecular-Instituto Europeo de Bioinformática) y el Instituto Wellcome Sanger

En cada nuevo genoma secuenciado el 40% aproximadamente que no ha sido caracterizado constituye un desafío especial. El esclarecimiento de la función de estos elementos genéticos probablemente necesite muchas décadas. Muchas de las aproximaciones experimentales tienen por objeto genes que codifican proteínas. Un cambio en el patrón de crecimiento o en otras propiedades de un organismo a consecuencia de la inactivación de un gen suministra información sobre la función fenotípica de la proteína producto del gen. Se han preparado por ingeniería genética colecciones con genes inactivados para diferentes genomas, incluidos los de *S. cerevisiae* y la planta *Arabidopsys thaliata*. Cada clon en la colección de un organismo tiene inactivado un gen distinto (excepto en el caso de los genes esenciales para la vida en todo momento) y una gran parte están presentes en el grupo de knockouts. Para un organismo unicelular como la levadura, las colecciones son completas. Para organismos pluricelulares complejos como el ratón, las colecciones de knockouts se construyen penosamente a lo largo del tiempo por muchos diferentes grupos de investigación, una mutación a la vez.



FIGURA 9-25 Cronograma de secuencias genómicas

El genoma humano contiene muchos tipos de secuencias

Estas bases de datos en rápido crecimiento no solo alimentan el progreso en todos los campos de la bioquímica, también han cambiado la manera de pensar acerca de nosotros mismos.

¿Qué nos dice nuestro genoma y su comparación con el de otros organismos?

Desde un cierto punto de vista, no somos tan complicados como imaginábamos. Las estimaciones de hace unas pocas décadas, que atribuían a los humanos unos 100.000 genes en los aproximadamente 3,2 x 10^9 pb del genoma humano, han sido sustituidas por el descubrimiento que tenemos solamente unos 20.000 genes que codifican proteínas, menos del doble de los de la mosca de la fruta (13.600 genes), no muchos más que un gusano nemátodo (20.000 genes) y menos que una planta de arroz (38.000 genes).

En otros aspectos, sin embargo, somos más complejos de lo que pensábamos. El estudio de la estructura de los cromosomas eucarióticos y de las secuencias genómicas ha revelado que muchos, si no la mayoría, de los genes eucarióticos contienen uno o más segmentos intercalados de DNA que no codifican la secuencia de aminoácidos del producto polipeptídico. Estos insertos no traducidos interrumpen la, por otra parte, relación colineal entre la secuencia de nucleótidos del gen y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. Estos segmentos de DNA no traducido se denominan **secuencias intercaladas** o **intrones**, y los segmentos codificantes se denominan **exones (Fig. 9-26).** Pocos genes bacterianos contienen intrones. Los intrones se eliminan del transcrito primario de RNA y los exones se empalman para general un transcrito que pueda ser traducido sin interrupción en un producto proteico (véase el Capítulo 26). Un exón a menudo (pero no siempre) codifica un único dominio de una proteína mayor con más de un dominio. Modos alternativos de expresión génica y el corte y empalme del RNA permiten la producción de varias combinaciones de exones, que dan lugar a la síntesis de más de una proteína a partir de un único gen. Los humanos comparten muchos tipos de dominios proteicos con las plantas, los gusanos y las moscas, pero usan estos dominios en combinaciones más complejas y por lo tanto generan proteínas más complejas.

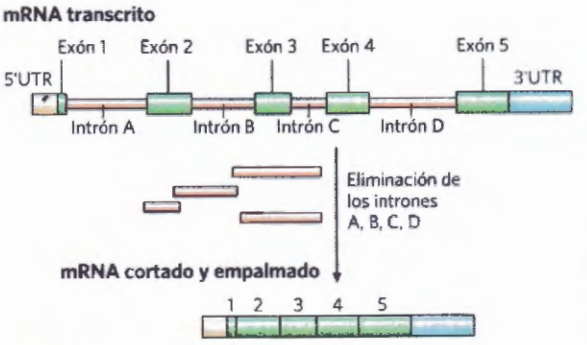


FIGURA 9-26 Intrones y exones. Este transcrito de un gen contiene cinco exones y cuatro intrones, junto con regiones no traducidas en 5′ y en 3′ (5′UTR y 3′UTR). El corte y empalme elimina los intrones para producir un mRNA que pueda traducirse a proteína.

En los mamíferos y algunos otros eucariotas, el gen típico posee una proporción mucho mayor de DNA intrónico que de DNA exónico; en la mayor parte de casos la función de los intrones no está clara. Sólo alrededor del 1,5% del DNA humano es "codificante" o exónico y contiene información para productos proteicos **(Fig. 9-27a)**. Sin embargo, cuando los intrones, que son mucho más grandes, se incluyen en el cómputo, la proporción de DNA representada por los genes llega al 30% del genoma humano. Investigaciones en curso tienen por objetivo clasificar los genes que codifican proteína de acuerdo con su función (Fig. 9-27b).

La relativa escasez de genes en el genoma humano deja a una gran cantidad de DNA sin función conocida. Mucho del DNA no génico consiste en secuencias repetidas de diferentes tipos. Tal vez lo más sorprendente sea que en torno a la mitad del genoma humano consista en secuencias moderadamente repetidas derivadas de elementos transponibles, segmentos de DNA de unos pocos centenares a varios millares de pares de bases de longitud, que pueden moverse de un lugar a otro del genoma. Descritos por vez primera vez en el maíz por Barbara McClintock, los elementos transponibles, o **transposones**, son una especie de parásito molecular. Se alojan en los genomas de prácticamente todos los organismos con eficiencia y de forma básicamente pasiva. Muchos transposones contienen genes que codifican las proteínas que catalizan el propio proceso de transposición, como se describe con más detalle en los Capítulos 25 y 26. Hay muchas clases de transposones en el genoma humano. Algunos son activos y se desplazan con baja frecuencia, pero la mayoría son inactivos, convertidos en reliquias evolutivas alteradas por mutaciones.

Una vez considerados los genes que codifican proteínas (incluyendo exones e intrones) y los transposones, resta aproximadamente un 25% del DNA total. La porción principal de éste consiste en secuencias únicas que se encuentran entre los genes que codifican proteínas. Como se describe en el Capítulo 26, prácticamente todos estos segmentos de DNA se transcriben a RNA, al menos en algunas células humanas. Continuamente se están descubriendo nuevas clases de RNA funcionales, codificados por genes cuya existencia no se sospechaba. Muchos genes que codifican RNA funcionales son difíciles de identificar por métodos automáticos, especialmente cuando sus productos de RNA no han sido caracterizados. Sin embargo, los genes que codifican RNA son claramente una característica destacada de estas regiones genómicas, por lo demás no exploradas.

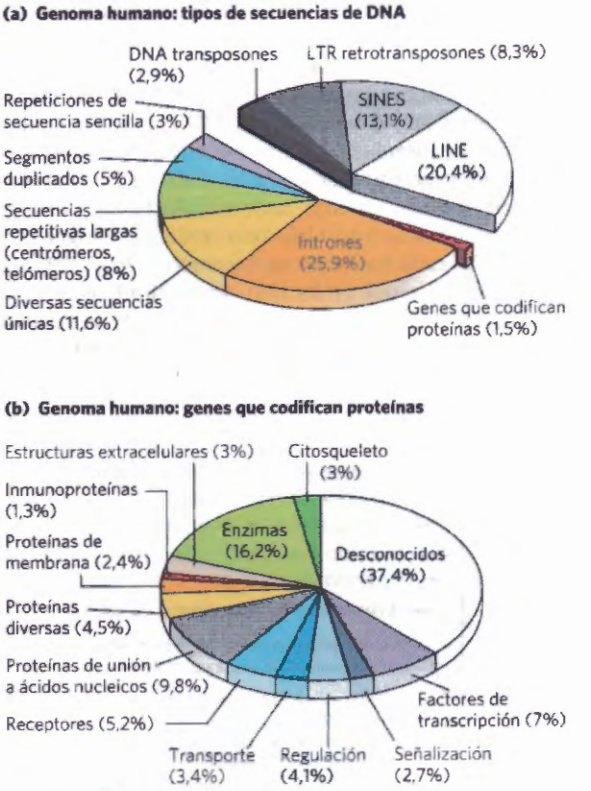


FIGURA 9-27 Una instantánea del genoma humano. (a) Este diagrama de sectores muestra las proporciones de diversos tipos de secuencia en nuestro genoma. Las clases de transposones que representan cerca de la mitad del total del DNA genómico se indican con tonos de gris. Los retrotransposones LTR son retrotransposones con repeticiones terminales largas (véanse las Figs 26-36). Los elementos nucleares intercalados largos (LINEs)y los elementos nucleares intercalados cortos ((SINEs) son clases especiales de transposones especialmente comunes. **(b)** Los aproximadamente 25.000 genes que codifican proteínas en el genoma humano pueden clasificarse por el tipo de proteína codificada. [Fuente (a) Datos de T.R. Gregory, *Nature Rev. Genet* 6699. 2005 (b) Datos de wwwpantherdb.org.]

Aproximadamente otro 3% del genoma humano consiste en secuencias altamente repetitivas, denominadas **repeticiones de secuencia sencilla (SSR)**. Generalmente más cortas de 10 pb, una SSR puede estar repetida millones de veces por célula y poseer importancia funcional identificable en el metabolismo celular humano. Los ejemplos más destacados de DNA SSR se encuentran en los centrómeros y en los telómeros (véase el Capítulo 24). Sin embargo, también pueden encontrarse largas repeticiones de secuencia sencilla en todo el genoma.

¿Qué nos dice toda esta información sobre las similitudes y las diferencias entre individuos humanos? En la población humana hay millones de diferencias de una sola base, denominadas **polimorfismos de un solo nucleótido**, o **SNP**. Cada ser humano difiere de otro en aproximadamente 1 par de bases de cada 1.000. Gran parte de las diferencias están causadas por SNP, pero se

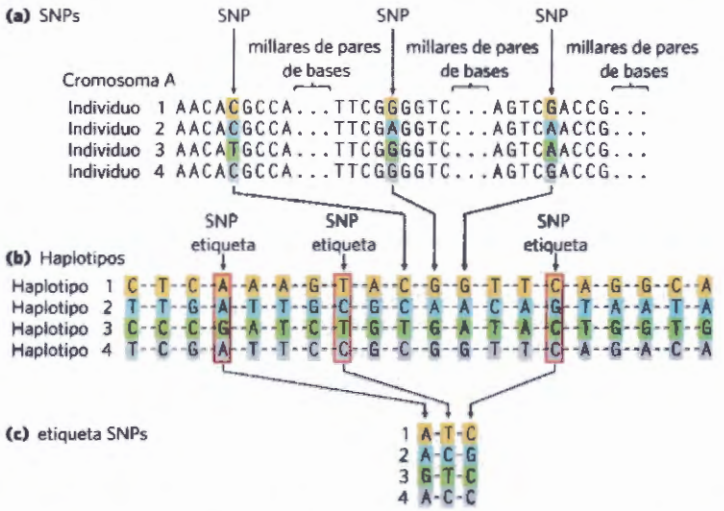


FIGURA 9-28 Identificación de haplotipos. **(a)** Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden identificarse en muestras del genoma. Los SNP pueden encontrarse en cualquier parte del genoma, con independencia de que formen parte de un gen conocido **(b)** Los grupos de SNP que se encuentran relativamente cercanos en un cromosoma (dentro de unas pocas decenas de millares de pares de bases) se compilan en un haplotipo. Los grupos de SNP variarán en la población humana en general del mismo modo que en los cuatro individuos ficticios mostrados en los paneles **(a)** y **(b)**. Sin embargo, los SNP elegidos para definir un haplotipo son, a menudo, los mismos en la mayoría de individuos de una determinada población. **(c)** Los SNP que definen un haplotipo (SNP etiqueta) pueden usarse para simplificar el proceso de identificación de un determinado haplotipo (mediante la secuenciación de 3 SNP representativos en lugar de un total de 20). Si se secuencian los SNP etiqueta, mostrados en rojo claro, los nucleótidos A, T y G, así como las tres sucesivas posiciones de los SNP etiqueta pueden ser característicos de un lugar del norte de Europa, mientras que los nucleótidos G, T y C en estas tres mismas posiciones genómicas podrían encontrarse en una población de Asia. Se usan múltiples haplotipos de este tipo para trazar la prehistoria de las migraciones humanas [Fuente. Información del International Hap Map Contortium, *Nature* 426:789, 2003, Fig. 1.]

encuentra un amplio abanico de deleciones mayores, inserciones y reorganizaciones a pequeña escala en las poblaciones humanas. De estas a menudo sutiles diferencias genéticas procede la diversidad humana de todos conocida, diferencias en el color del pelo, en la visión, en las alergias, en la talla del pie, e incluso (en grado desconocido) en el comportamiento.

El proceso de recombinación genética y segregación cromosómica durante la meiosis tiende a mezclar y emparejar estas pequeñas diferencias genéticas, lo que hace que se hereden diferentes combinaciones de genes (véase el Capítulo 25). Cuando dos de tales diferencias genéticas se encuentran en cromosomas diferentes, las variantes concretas heredadas por un individuo determinado son resultado del azar. Si las variantes genéticas se encuentran en el mismo cromosoma, la probabilidad de que se hereden juntas es inversamente proporcional a la distancia que las separa. Los grupos de SNP y otras diferencias genéticas que están cerca en el mismo cromosoma raramente experimentan recombinación y normalmente se heredan juntos. Estos agrupamientos se conocen como **haplotipos**. Los haplotipos son buenos marcadores para ciertas poblaciones humanas y para individuos dentro de poblaciones.

Definir un haplotipo requiere varias etapas. En primer lugar, se identifican las posiciones que contienen SNP en la población humana en muestras de DNA genómico de muchos individuos **(Fig. 9-28a)**. Cada SNP puede estar separado del siguiente por muchos miles de pares de bases. Segundo, los SNP que se encuentran relativamente cerca unos de otros en un cromosoma y que, por lo tanto, se heredan juntos se reúnen en haplotipos (Fig. 9-30b). Cada haplotipo consiste en las bases en particular que se encuentran en las diversas posiciones de los SNP del haplotipo. Finalmente, se eligen SNP de identificación, un subconjunto de SNP que definen el haplotipo entero, para identificar cada haplotipo de manera inequívoca (Fig. 9-28c). La sola secuenciación de las posiciones de identificación de las muestras genómicas de las poblaciones humanas permite identificar rápidamente los haplotipos presentes en cada individuo. En el genoma mitocondrial (que al ser heredado exclusivamente por línea materna nunca experimenta recombinación meiótica) y en el cromosoma Y en los machos (sólo el 3% del cual es homólogo del cromosoma X, y, por tanto, sujeto a recombinación) se encuentran haplotipos especialmente estables.

La secuenciación del genoma suministra información sobre aquello que nos hace humanos

Un propósito primario de la mayoría de proyectos de secuenciación consiste en identificar elementos genéticos conservados de importancia funcional, tales como secuencias de exones conservadas, regiones reguladoras y otras características genómicas tales como los centrómeros y los telómeros. Uno de los objetivos principales de la secuenciación del genoma humano es la identificación de las diferencias entre nuestro genoma y el de otros organismos. Aunque el genoma humano está estrechamente relacionado con el de otros mamíferos a lo largo de grandes segmentos de todos los cromosomas, diferencias de un pequeño tanto por ciento de los miles de millones de pares de bases del genoma equivalen a millones de diferencias genéticas. La identificación de estas diferencias utilizando las técnicas de la genómica comparada puede revelar las causas de las enferme-

dades genéticas humanas y puede ayudar a identificar genes, alteraciones genéticas y otras características genómicas exclusivas de los humanos y que, por tanto, puedan probablemente contribuir a la definición de características propias de los humanos tales como nuestro cerebro de gran tamaño, la capacidad lingüística, la habilidad para fabricar herramientas o el bipedalismo.

Las secuencias genómicas de nuestros parientes biológicos más próximos, los chimpancés (*Pan troglodytes*) y los bonobos (*Pan paniscus*), ofrecen pistas interesantes que pueden ilustrar el proceso comparativo. Los humanos y los chimpancés compartieron un antepasado común hace unos 7 millones de años. Las diferencias genómicas entre las dos especies son de dos tipos: cambios de pares de bases (SNP) y reorganizaciones genómicas a mayor escala de muchos tipos. Los SNP de las regiones que codifican proteínas a menudo dan lugar a cambios de aminoácidos que pueden usarse para construir un árbol filogenético **(Fig. 9-29a)**. Segmentos de cromosomas pueden invertirse durante la evolución. Los procesos que causan estas inversiones son complejos y poco frecuentes, pero el linaje humano posee largos segmentos de DNA invertidos (en relación con otros primates) debidos a estos procesos en los cromosomas 1, 12, 15, 16 y 18. También pueden producirse fusiones de cromosomas. En el linaje humano, dos cromosomas encontrados en otros linajes de primates se han fusionado para formar el cromosoma humano 2 (Fig. 9-29a). El linaje humano posee, pues, 23 parejas de cromosomas en lugar de las 24 típicas de otros primates. Una vez que apareció esta fusión en el linaje que condujo a los humanos, representaría una importante barrera para el cruzamiento con otros primates que no la poseyeran.

Si ignoramos los transposones y los grandes reordenamientos cromosómicos, los genomas publicados del chimpancé y humanos difieren sólo en un 1,23% de los pares de bases (comparado con el 0,1% de variación de un humano a otro). Si además ignoramos los cambios en las posiciones donde se encuentran polimorfismos conocidos tanto en las poblaciones de chimpancés y humanos (éstos difícilmente representan cambios evolutivos relacionados con la determinación de la especie), las diferencias representan alrededor del 1,06%, o 1 de cada 100 pb. Este pequeño porcentaje representa más de 30 millones de cambios de pares de bases, algunos de los cuales afectan la función proteica y la regulación génica. Los reordenamientos del genoma que ayudan a distinguir los chimpancés de los humanos consisten en 5 millones de cortas inserciones o deleciones de unos pocos pares de bases cada una, así como un número sustancial de inserciones, deleciones, inversiones o duplicaciones más largas, que pueden tener muchos miles de pares de bases. Cuando se tiene en cuenta la inserción de transposones, una importante fuente de variación genética, las diferencias entre los genomas del chimpancé y los humanos aumentan en unos 90 millones de pb, lo que representa otro 3% de estos genomas. De hecho, cada especie tiene segmentos de DNA, que representan de 40 a 45 millones de pb, que son totalmente únicos de cada genoma en particular, con grandes inserciones, duplicaciones y otros reordenamientos que afectan más pares de bases que los cambios de un solo nucleótido. Por los tanto, la diferencia

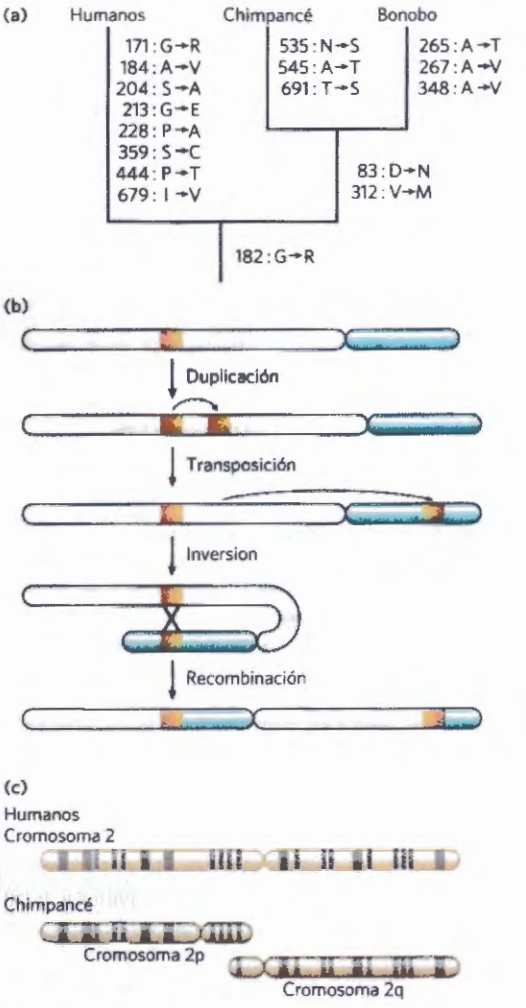


FIGURA 9-29 Alteraciones genómicas en el linaje humano. (a) Este árbol evolutivo se deriva de secuencias del receptor de la progesterona, que contribuye a la regulación de muchos aspectos de la reproducción. El gen que codifica esta proteína ha sufrido más alteraciones evolutivas que la mayoría. Los cambios de amino ácidos asociados exclusivamente a humanos, chimpancés y bonobos están indicados con el número de residuo al lado de cada rama. **(b)** Uno de los procesos multietapa que pueden desembocar en la inversión de un segmento cromosómico. Un gen de un segmento cromosómico se duplica y a continuación se desplaza a otra localización cromosómica por transposición. La recombinación de los dos segmentos puede provocar a una inversión del DNA entre ambos segmentos. **(c)** Los genes en los cromosomas 2p y 2q del chimpancé son homólogos de los que se encuentran en el cromosoma 2 humano, lo cual implica que los dos cromosomas se unieron en uno solo en algún punto de la línea que conduce a los humanos. Las regiones homólogas pueden tener la apariencia de bandas, generadas en la metafase por ciertos colorantes, taal como aquí se muestra. (Fuente. **(a)** información de *C. Chen. Mol Philogenet Evol* 47 637,2008)

global entre los chimpancés y los humanos representa alrededor del 4% de sus genomas.

Averiguar cuáles son las diferencias genómicas responsables de las características propias de los humanos es una tarea titánica. Si las dos especies comparten un antepasado común, entonces, suponiendo una velocidad de evolución similar en ambos linajes, la mitad de los cambios representan cambios en el linaje del chimpancé y la otra mitad representan cambios en el linaje

humano. Cuando se observa una diferencia, ¿cómo se puede averiguar qué variante estaba presente en el antepasado común? Una manera consiste en comparar ambas secuencias genómicas con las de organismos más alejados, designados como **exogrupos**. Supongamos un locus X, donde se encuentra una diferencia entre los genomas del chimpancé y los humanos **(Fig. 9-30)**. El linaje del orangután, un exogrupo, divergió del de los chimpancés y los humanos antes del antepasado común de los chimpancés y los humanos. Si la secuencia del locus X es idéntica en los orangutanes y los chimpancés, esta secuencia se encontraba probablemente en el antepasado de los chimpancés y los humanos, y la secuencia humana es específica del linaje humano. Las secuencias idénticas en humanos y orangutanes pueden descartarse como candidatas para secuencias genómicas específicas de humanos. La importancia de las comparaciones con exogrupos estrechamente relacionados ha dado lugar a nuevos esfuerzos en la secuenciación de los genomas del orangután, macacos y muchas otras especies de primates.

La búsqueda de los fundamentos genéticos de las características específicas de los humanos, tales como la superior funcionalidad cerebral, puede beneficiarse de dos enfoques distintos y complementarios. El primero, busca regiones genómicas que presenten cambios extremos en relación con otros primates. Entre ellos se incluyen múltiples duplicaciones génicas o la adición de grandes segmentos genómicos que no están presentes en otros primates. El segundo, se centra en genes implicados en dolencias humanas importantes. En relación con la función cerebral, por ejemplo, se examinarían genes que, al sufrir mutaciones, contribuyesen a desordenes mentales cognitivos o de otro tipo.

Es destacable que los análisis del linaje humano no hayan detectado un enriquecimiento de los cambios genéticos de los genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo del cerebro o en su tamaño. En los primates, la mayor parte de genes que sólo son funcionales en el cerebro están incluso más conservados que los genes que son funcionales en otros tejidos. Sin embargo, se observan algunas diferencias en la expresión génica. Cuando se examinan los cambios en las regiones del genoma relacionadas con la regulación génica, los genes implicados en el desarrollo y la nutrición neurales están afectados de manera desproporcionada. Diversos genes que codifican RNA, algunos con expresión predominante en el cerebro, también muestran señales de evolución acelerada **(Fig. 9-31)**. Las muchas clases de RNA que se están descubriendo (véase el Capítulo 26) probablemente cambien de manera radical nuestra perspectiva de cómo la evolución modifica el funcionamiento de los seres vivos. Es cada vez más evidente que puede que no sea tan importante qué genes se expresan sino cuándo, dónde y en que cuantía se expresan.

Las comparaciones genómicas ayudan a localizar los genes implicados en enfermedades

El Proyecto del Genoma Humano ha cumplido las expectativas en el descubrimiento de genes implicados en enfermedades genéticas: más de 1.600 enfermedades genéticas humanas han sido asociadas a

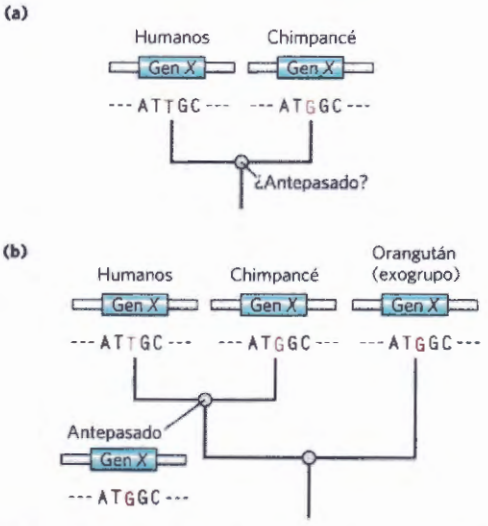


FIGURA 9-30 Determinación de alteraciones de la secuencia exclusivas de un linaje ancestral. **(a)** Se comparan las secuencias del mismo gen hipotético en humanos y chimpancés. Se desconoce la secuencia de este gen en el último antepasado común. **(b)** El genoma del orangután se usa como exogrupo. La secuencia del gen del orangután es idéntica a la del gen del chimpancé. Esto significa que la mutación que causa la diferencia entre los humanos y los chimpancés tuvo lugar con casi total seguridad en el linaje que conduce hasta los humanos modernos, y que el antepasado común de los humanos y los chimpancés (y los orangutanes) tenía la secuencia que ahora se encuentra en los chimpancés.

genes concretos. Mediante el método denominado **análisis de ligamiento**, el gen implicado en una determinada enfermedad se mapea en relación con polimorfismos genéticos bien caracterizados que se encuentran al lo largo de todo el genoma humano. La búsqueda empieza a menudo con uno o más grupos familiares que incluyan varios individuos afectados por una enfermedad determinada durante varias generaciones. El enfoque más común es básicamente un ejercicio de filogenética (el estudio de las relaciones evolutivas entre grupos de organismos) y se fundamenta sólidamente en conceptos derivados de la biología evolutiva. Se puede ilustrar con la búsqueda de un gen implicado en la enfermedad de Alzheimer. Alrededor del 10% de todos los casos de esta enfermedad en Estados Unidos resultan de una predisposición genética. Se han descubierto diversos genes que al mutar pueden provocar la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer. Uno de estos genes (*PS1*) codifica la proteína presenilina-1, y su descubrimiento hizo un uso exhaustivo del análisis de ligamiento.

Así como los haplotipos se basan en SNP que se encuentran cerca unos de otros en un cromosoma, el análisis de ligamiento implica la búsqueda de SNP que se encuentren cerca del gen estudiado. Esta clase de investigaciones se centran en familias afectadas por la enfermedad en las que se puedan obtener muestras de DNA pertenecientes a individuos de varias generaciones. Se obtienen muestras de DNA tanto de familiares afectados como no afectados. Primero se localiza la región asociada con la enfermedad en un cromosoma determinado, utilizando grupos (denominados paneles) de localizaciones genómicas en las que SNP comunes u otras alteraciones genómicas cartografiadas estén presentes en una proporción significativa de la población

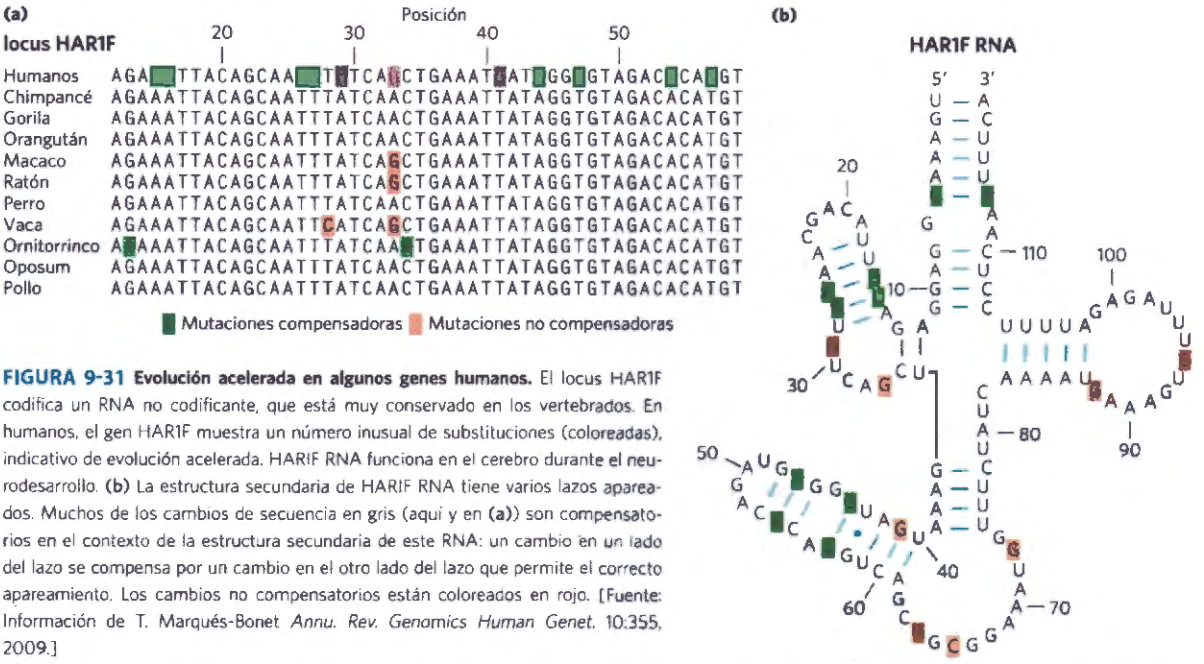


FIGURA 9-31 Evolución acelerada en algunos genes humanos. El locus HAR1F codifica un RNA no codificante, que está muy conservado en los vertebrados. En humanos, el gen HAR1F muestra un número inusual de substituciones (coloreadas), indicativo de evolución acelerada. HARIF RNA funciona en el cerebro durante el neurodesarrollo. **(b)** La estructura secundaria de HARIF RNA tiene varios lazos apareados. Muchos de los cambios de secuencia en gris (aquí y en **(a)**) son compensatorios en el contexto de la estructura secundaria de este RNA: un cambio en un lado del lazo se compensa por un cambio en el otro lado del lazo que permite el correcto apareamiento. Los cambios no compensatorios están coloreados en rojo. [Fuente: Información de T. Marqués-Bonet *Annu. Rev. Genomics Human Genet.* 10:355, 2009.]

humana. Por lo tanto, muchos, aunque no todos, los humanos presentarán diferencias en la secuencia genómica en estas localizaciones. Los genotipos de individuos con y sin la enfermedad se comparan, con atención particular a los familiares cercanos, utilizando un panel que incluye varios loci de SNP bien caracterizados en cada cromosoma. En la enfermedad de Alzheimer, dos de los muchos árboles genealógicos utilizados para buscar este gen a principios de la década de 1990 se muestran en la **Figura 9-32a**. Mediante estos árboles genealógicos se buscan las variantes de los SNP que se heredan con el mismo o muy semejante patrón que el gen causante de la enfermedad. El gen responsable puede localizarse gradualmente hasta llegar a un único cromosoma, siempre que la herencia de las variantes particulares de los SNP en este cromosoma sea una imagen fiel de la herencia de la enfermedad. Una localización más detallada en el cromosoma de un gen causante de una enfermedad depende de métodos estadísticos que permitan correlacionar la herencia de polimorfismos adicionales más cercanos con la presencia de la enfermedad. El método se centra en un panel de polimorfismos más denso que se sabe que se encuentran en el cromosoma de interés. Cuanto más cerca se encuentre un marcador del gen de una enfermedad, más probable será que se herede junto con él. Este proceso puede indicar la región del cromosoma que contiene el gen. En este ejemplo de la enfermedad de Alzheimer, el análisis de ligamiento mostró que el gen causante de la enfermedad se encontraba cerca del locus del SNP denominado D14S43 (Fig. 9-34c).

Los últimos pasos de la búsqueda de un gen de una enfermedad recurren, de nuevo, a las bases de datos del genoma humano. Se examina la región que contiene el gen y se identifican los genes que contiene. Se secuencia el DNA de muchos individuos a lo largo de esta región, algunos que sufren la enfermedad y otros no. Este proceso conduce gradualmente, con el aumento del número de individuos analizados, a la identificación de variantes del gen presentes sistemáticamente en individuos enfermos y ausentes en individuos sanos. La comprensión de la función de los genes en la región estudiada puede facilitar la búsqueda ya que determinadas rutas metabólicas pueden producir la enfermedad con mayor probabilidad que otras. En 1995, el gen del cromosoma 14 asociado con la enfermedad de Alzheimer fue identificado como el gen *S182*. Al producto de este gen se le dio el nombre de presenilina-1, y el propio gen fue renombrado como *PS1*.

Más complejos son los casos en que una enfermedad es causada por la presencia de mutaciones en dos genes distintos (ninguno de los cuales por sí solo provoca la enfermedad) o cuando una determinada enfermedad resulta agravada por una mutación, por lo demás inocua, en otro gen. La identificación de los genes y de las mutaciones responsables de tales enfermedades digénicas es extremadamente difícil. A veces, sólo es posible documentar estas enfermedades en poblaciones pequeñas, aisladas y altamente consanguíneas.

Las bases de datos del genoma ofrecen vías alternativas para la identificación de genes asociados a enfermedades, especialmente cuando se dispone de información bioquímica sobre la enfermedad. En la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de la β–proteína amiloide en los córtex límbico y de asociación del cerebro es responsable, al menos en parte, de los síntomas. Los defectos de la presenilina-1 (y una proteína relacionada, presenilina-2, codificada por un gen del cromosoma 1) provocan elevados niveles corticales de β–proteína amiloide. Bases de datos especializadas catalogan esta información funcional sobre los productos proteicos de los genes y sobre las redes de interacciones de las proteínas, la situación de los SNP y otros datos, y procuran una vía rápida para la identificación de genes candidatos para una determinada enfermedad. El conocimiento de los tipos de enzimas u otras proteínas que probablemente contribuyen a una enfermedad permite usar estas bases de datos para generar una lista de genes de

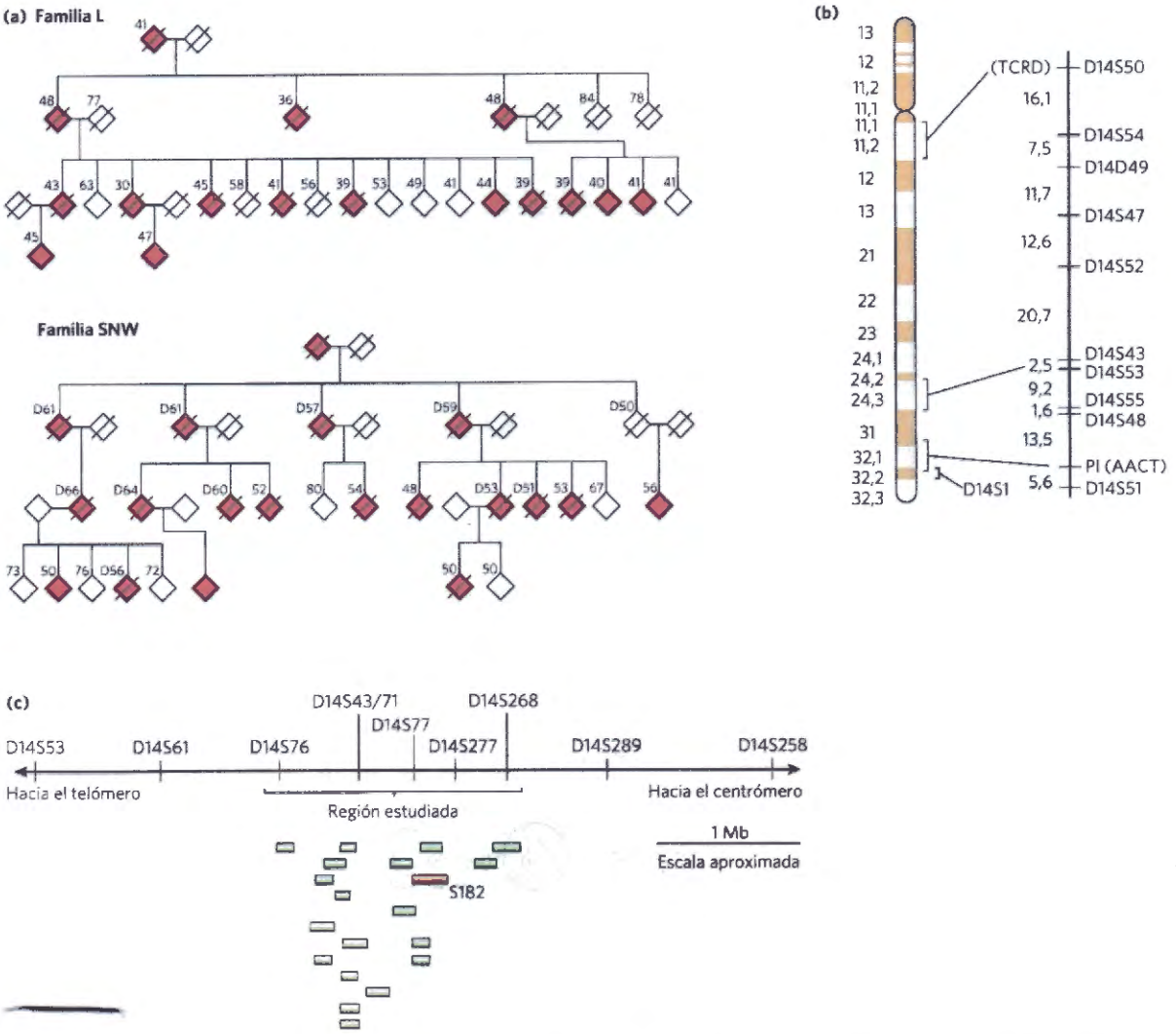


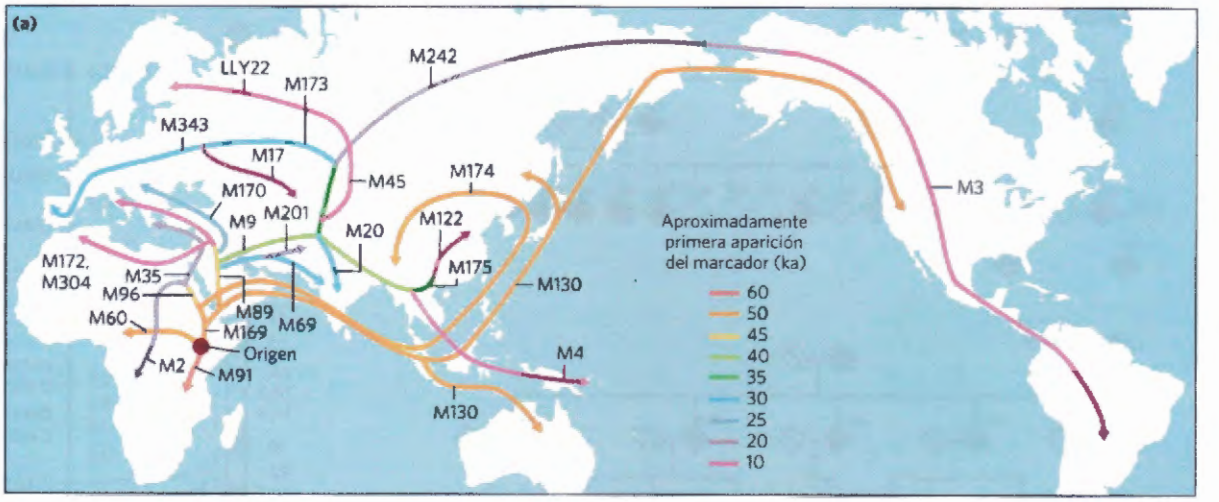
FIGURA 9-32 El análisis de ligamiento en el descubrimiento de genes de enfermedades. **(a)** Estos árboles genealógicos de dos familias afectadas por la enfermedad de Alzheimer de aparición temprana se basan en los datos disponibles en el momento del estudio. Los símbolos rojos representan los individuos afectados; la barras indican los fallecimientos sea antes o poco después del estudio. El número encima de cada símbolo es la edad del individuo en el momento del estudio o en el momento de la muerte (indicado con una D). Para proteger la privacidad de la familia no se indica el género. **(b)** El cromosoma 14, con bandas producidas por ciertos colorantes. Las posiciones de los marcadores cromosómicos se muestran a la derecha, con la distancia genética entre ellos expresada en centimorgans, que reflejan la frecuencia de recombinación entre ellos. *TCRD* (receptor delta de las células T) y *PI* (AACT (α1-antiquimotripsina)) son genes con alteraciones en la población humana que se usaron como marcadores, junto con los SNP, en el cartografiado cromosómico. **(c)** La comparación de los DNA de miembros afectados y no afectados de la familia, permitió finalmente definir una región de interés cerca del marcador D14S43, que contiene 19 genes expresados. El gen denominado *S182* (rojo) codifica la presenilina-1. (1Mb=106 pares de bases). [Fuentes: (a, b) Información de G D. Schellenberg et al. *Science* 258:668, 1992. (c). Información de R.Sherrington et al. *Nature* 375:754, 1995.]

proteínas con funciones relevantes, genes adicionales no caracterizados con relaciones ortólogas o parálogas con los genes de la lista, una lista de proteínas que interaccionan con las proteínas diana o con los ortólogos de otros organismos o para mapear la posición de los genes. Con datos de árboles genealógicos seleccionados, a menudo se puede elaborar rápidamente una lista de genes potencialmente relevantes.

Estos enfoques no están limitados a las enfermedades humanas. Se pueden usar los mismos métodos para identificar los genes implicados en enfermedades, o genes que producen características deseables, en otros animales y en las plantas. ■

Las secuencias genómicas iluminan nuestro pasado y ofrecen oportunidades de futuro

Hace unos 70.000 años, un pequeño grupo de humanos en África se dirigieron a Asia a través del Mar Rojo. Estimulados por una innovación en la construcción de pequeños botes, o impulsados por conflictos o por el hambre, o simplemente por curiosidad cruzaron la barrera del agua. La colonización inicial, que constaba tal vez de 1.000 individuos, inició un periplo que no se detuvo hasta que los humanos alcanzaron la Tierra de Fuego (en el extremo sur de Sudamérica) muchos miles de años más tarde. En el curso de este proceso, la población establecida, procedente de una previa expan-



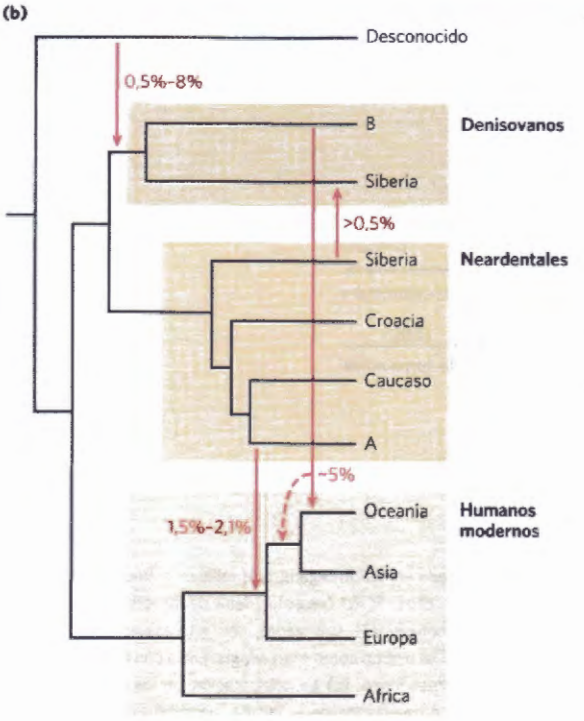


FIGURA 9-33 Las rutas de las migraciones humanas. (a) Cuando una pequeña parte de una población humana se separa de un grupo mayor lleva consigo sólo una parte de la diversidad genética global. Por lo tanto algunos haplotipos están presentes en el grupo que ha migrado, pero muchos no lo están. Al mismo tiempo, las mutaciones pueden crear nuevos haplotipos con el tiempo. Este mapa fue generado a partir de un análisis de los marcadores genéticos del cromosoma Y (haplotipos establecidos con números M o LLY). Las muestras geréticas fueron tomadas de poblaciones indígenas establecidas desde mucho tiempo atrás en puntos geográficos a lo largo de las rutas indicadas. Los haplotipos que aparecen de improviso a lo largo de la ruta migratoria, como resultado de cambios nuevos (mutaciones) en determinadas localizaciones genómicas de SNP de ciertas poblaciones aisladas se denominan "acontecimientos fundadores". Estos permiten trazar las migraciones a partir de este punto, puesto que otras poblaciones que poseen el nuevo haplotipo probablemente sean descendientes de la población fundadora. La abreviación KYA significa "hace miles de años". **(b)** Las migraciones humanas finalmente desplazaron varios grupos de homínidos estrechamente relacionados, pero no antes de que se hubiese producido un cierto grado de mezcla. Este árbol muestra el flujo genético documentado a partir de secuencias genómicas detalladas de humanos antiguos y modernos, así como de Neardentales y Denisovanos. En todos los humanos antiguos con herencia eurásica se detecta DNA de un grupo desconocido de neardentales **(A)**. La transferencia de DNA desde un antepasado desconocido a la línea de los denisovanos **(B)** contribuyó a los antepasados de los individuos actuales nativos de Australia y las islas del Pacífico (Oceanía). [Fuentes: **(a)** Información de G. Stix, *Sci. Am.* 299 (July):56, 2008. **(b)** Información de S. Pääbo, *Cell* 157:216, 2014.]

sión de los homínidos en Eurasia, incluyendo el *Homo neanderthalensis*, fue desplazada. Los neandertales desaparecieron, del mismo modo que el *Homo erectus* y otros linajes de homínidos habían desaparecido antes que ellos.

La historia de cómo los humanos modernos aparecieron por primera vez en África hace unos pocos centenares de miles de años y de sus migraciones fuera de África está escrita en nuestro DNA. Gracias al uso de secuencias genómicas de muchas especies, se ha podido estudiar con mayor precisión la evolución de los primates y de los homínidos. Aprovechando los haplotipos de las poblaciones actuales se pueden seguir las migraciones de nuestros intrépidos antepasados alrededor del planeta **(Fig. 9-33a)**. Los Neandertales no fueron simplemente desplazados. Hubo una cierta mezcla (Fig. 9-33b). Gracias al uso de métodos sensibles basados en la PCR, actualmente se dispone de la secuencia casi completa del genoma de los neandertales (Recuadro 9-2). Sabemos que alrededor del 5% de los genomas humanos no africanos procede de los neandertales. Algunas poblaciones humanas también adquirieron DNA genómico de un grupo recientemente descubierto, los denisovanos. El DNA de los neandertales proporcionó a los humanos un sistema inmunológico más complejo, que nos hizo más resistentes a las infecciones, pero también un poco más susceptibles a las enfermedades autoinmunes. La historia de nuestro pasado está tomando forma paulatinamente, a medida que se completan más genomas humanos, de aquellos que viven hoy y de aquellos que vivieron en los pasados milenios.

Las posibilidades médicas ofrecidas por las secuencias genómicas personalizadas se amplían a medida que se descubren más genes implicados en enfermedades hereditarias. El conocimiento de las secuencias genómicas también ofrece la posibilidad de alterarlas. En la

actualidad es habitual manipular las secuencias de DNA de organismos que van de las bacterias y las levaduras a las plantas y los mamíferos para la investigación y con propósitos comerciales. Los esfuerzos dirigidos a curar enfermedades humanas heredadas mediante terapia génica todavía no han mostrado todo su potencial, pero las tecnologías para la introducción de genes mejoran constantemente. Pocas disciplinas científicas afectarán más el futuro de nuestra especie que la genómica moderna.

RESUMEN 9.3 La genómica y la historia humana

- Alrededor del 30% del DNA del genoma humano se encuentra en exones e intrones de genes que codifican proteínas. Cerca de la mitad del DNA procede de trans-

RECUADRO 9-2 MEDICINA Los parientes más próximos de la humanidad

Los humanos modernos y los neandertales coexistieron en Europa y Asia hasta hace sólo unos 30.000 años. Las poblaciones ancestrales de los humanos y neandertales divergieron hace unos 370.000 años, antes de la aparición de los humanos anatómicamente modernos. Los neandertales usaban herramientas, vivían en pequeños grupos y enterraban a sus muertos. Los neandertales son los homínidos conocidos más cercanos de los humanos modernos. Durante centenares de miles de años habitaron extensas regiones de Europa y Asia occidental (Fig. 1). Si el genoma del chimpancé puede decirnos algo acerca de qué es un ser humano, es posible que el genoma del neandertal pueda decirnos todavía más. Ocultos en los huesos y los restos recuperados de sepulturas se encuentran fragmentos del DNA genómico del neandertal. Las tecnologías desarrolladas para los estudios forenses (véase el Recuadro 9-1) y para el estudio del DNA antiguo se han combinado para iniciar el proyecto genoma del neandertal.

Este empeño es distinto de los proyectos genoma de especies existentes. El DNA de neandertal se encuentra en pequeñas cantidades y está contaminado con DNA de otros animales y de bacterias. ¿Cómo se consigue y cómo se puede estar seguro de que las secuencias realmente proceden de neandertales? Las respuestas provienen de novedosas aplicaciones de la biotecnología. En esencia, las pequeñas cantidades de fragmentos de DNA encontrados en un hueso de neandertal u otros restos se clonan en una genoteca y los fragmentos de DNA clonados se secuencian al azar, contaminantes incluidos. Los resultados de la secuenciación se comparan con las secuencias de los genomas humano y del chimpancé ya existentes. Los segmentos procedentes del DNA del neandertal se distinguen fácilmente de los segmentos procedentes de bacterias o insectos por análisis computacional, porque tienen secuencias estrechamente relacionadas con el DNA humano o del chimpancé. Una vez secuenciada una colección de segmentos de DNA de neandertal, éstos pueden usarse para identificar secuencias en muestras antiguas que se solapen con estos fragmentos conocidos.

El problema potencial de la contaminación con el DNA estrechamente relacionado de los humanos modernos puede controlarse examinando el DNA mitocondrial. Las poblaciones humanas poseen haplotipos (conjuntos característicos de diferencias genómicas; véase la Fig. 9-30) fácilmente identificables en su DNA mitocondrial. El análisis de muestras de neandertales ha mostrado que el DNA mitocondrial de los neandertales posee sus propios haplotipos. La presencia en las muestras de neandertales de algunas diferencias de pares de bases, que se encuentran en la base de datos del chimpancé pero no en la base de datos de los humanos constituye una evidencia adicional a favor de que tengamos entre manos secuencias de homínidos no humanos.



FIGURA 1 Los neandertales ocuparon buena parte de Europa y Asia occidental hasta hace unos 30.000 años. Se muestran los principales yacimientos arqueológicos de neandertales. (Obsérvese que el grupo fue nombrado por el yacimiento en Neanderthal en Alemania).

RECUADRO 9-2 MEDICINA Los parientes más próximos de la humanidad (*Continuación*)

La coronación de este esfuerzo estimulante está cerca. El borrador de la secuencia de genoma de los neandertales publicado a principios de 2009 cubría más del 60 % de las secuencias genómicas. La secuencia completa requerirá un pequeño esfuerzo adicional. Los resultados indican que los humanos modernos y los neandertales que fueron la fuente de este DNA compartieron un antepasado común hace unos 700.000 años. El análisis del DNA mitocondrial sugiere que los dos grupos continuaron en la misma línea, con algún flujo genético entre ellos, durante 300.000 años más. Las líneas se separaron con la aparición de los humanos anatómicamente modernos, aunque ahora hay pruebas a favor de cierto intercambio entre las líneas algo más tarde.

Las genotecas ampliadas de DNA de neandertales procedente de diferentes conjuntos de restos debería permitir finalmente un análisis de la diversidad genética de los neandertales, y tal vez de sus migraciones, que nos permitiría una mirada fascinante sobre nuestro pasado como homínidos.

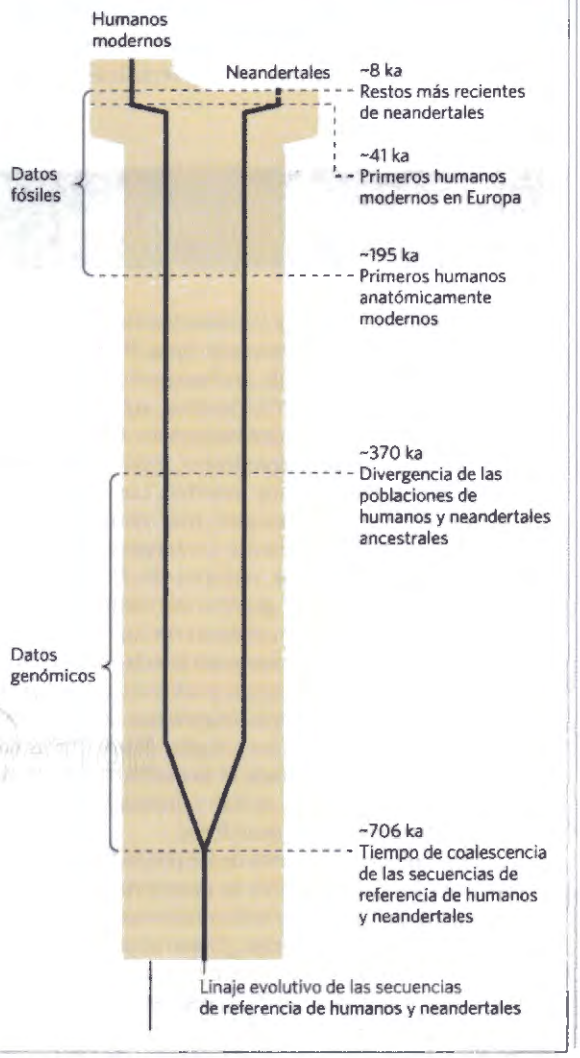


FIGURA 2 Este cronograma muestra la divergencia de las secuencias genómicas de humanos y neandertales (líneas negras) y de poblaciones ancestrales de humanos y neandertales (recuadro amarillo). Los datos genómicos están a favor de una cierta mezcla de poblaciones hasta alrededor de hace 45.000 años. Los momentos destacados de la evolución humana están indicados.

posones parásitos. Buena parte del resto codifica RNA de muchos tipos. Los centrómeros y los telómeros contienen repeticiones de secuencia sencilla.

- Las alteraciones génicas propias del ser humano pueden determinarse mediante genómica comparada usando otros primates.
- La genómica comparada se usa para localizar las alteraciones génicas que determinan las enfermedades hereditarias y también puede usarse para estudiar la evolución y la migración de nuestros antepasados humanos a lo lago de milenios.

Términos Clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

Genoma 319
Genómica 319
biología de sistemas 319
clonación 320
vector 320
DNA recombinante 320
Tecnología del DNA recombinante 320
ingeniería genética 320
endonucleasas de restricción 321
DNA ligasas 321
plásmido 324
cromosoma artificial bacteriano (BAC) 325
cromosoma artificial de levadura (YAC) 326
vector de expresión 328
baculovirus 329
bacmido 329
mutagénesis específica de sitio 330
proteína de fusión 331
etiqueta 331
PCR cuantitativa (qPCR) 333
genoteca de DNA 334
genoteca genómica 334
DNA complementario (cDNA) 335
Genoteca de cDNA 335
genómica comparada 335
ortólogos 335
parálogos 335
sintenia 335
epítopo de identificación 336
análisis del doble híbrido en levadura 339
chip de DNA 340
CRISPR/Cas 342
RNA guía (gRNA) 342
RNA CRISPR transactivador (tracrRNA) 342
anotación del genoma 343
polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) 346
haplotipo 347

Problemas

1. Manipulación de DNA clonado Al unir dos o más fragmentos de DNA la secuencia en el lugar de unión se puede diseñar de muchas formas, como muestran los siguientes ejercicios.

(a) Dibuje la estructura de cada extremo de un fragmento de DNA lineal producido por digestión con *Eco*RI (incluyendo las secuencias remanentes de la secuencia de reconocimiento de *Eco*RI).

(b) Dibuje la estructura resultante de la reacción de la DNA polimerasa I con el extremo de esta secuencia en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (véase la Fig. 8-34).

(c) Escriba la secuencia de la unión que resulta si se ligan dos extremos con la estructura derivada de (b) (véase la Fig. 25-16).

(d) Dibuje la estructura resultante si la estructura derivada de (a) se trata con una nucleasa que sólo degrade DNA monohebra.

(e) Escriba la secuencia producida en la zona de unión si un extremo con la estructura (b) se liga con un extremo con la estructura (d).

(f) Dibuje la estructura de un extremo de un fragmento de DNA lineal producido por digestión con *Pvu*II (incluyendo las secuencias remanentes de la secuencia de reconocimento de *Pvu*II).

(g) Escriba la secuencia producida en la zona de unión si un extremo con la estructura (b) se liga con un extremo con la estructura (f).

(h) Suponga que se puede sintetizar un fragmento corto de DNA dúplex de cualquier secuencia deseada. Con este fragmento sintético y con los procedimientos descritos de (a) a (g), diseñe un protocolo para eliminar el sitio de restricción para *Eco*RI de una molécula de DNA e introducir un nuevo sitio de restricción para *Bam*HI en una localización próxima (véase la Fig. 9-2).

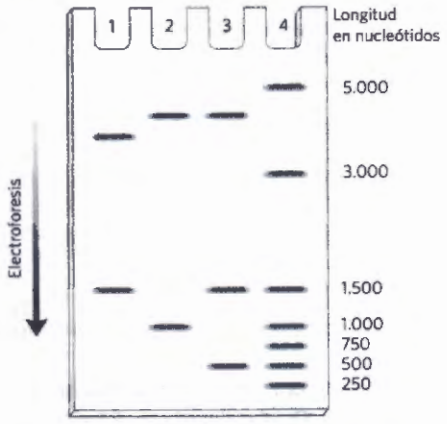
(i) Diseñe cuatro fragmentos cortos de DNA sintético de doble cadena que permitan la ligación de la estructura (a) con un fragmento de DNA producido por una digestión con *Pst*I. En uno de estos fragmentos sintéticos, diseñe la secuencia de manera que la unión final contenga las secuencias de reconocimiento tanto para *Eco*RI como para *Pst*I. En el segundo y tercer fragmentos, diseñe la secuencia de tal modo que la unión contenga sólo la secuencia de reconocimiento para *Eco*RI o sólo para *Pst*I. Diseñe la secuencia del cuarto fragmento de tal modo que en la región de unión no aparezca ni la secuencia para *Eco*Ri ni la de *Pst*I.

2. Selección de plásmidos recombinantes Cuando se clona un fragmento de DNA foráneo en un plásmido, en general es útil insertar el fragmento en un sitio que interrumpa un marcador seleccionable (tal como el gen de resistencia a la tetraciclina de pBR322). La pérdida de la función del gen interrumpido se puede aprovechar para identificar clones que contengan plásmidos recombinantes con DNA foráneo. Con el bacteriófago λ como vector este criterio de selección es innecesario; no obstante, los vectores que han incorporado grandes fragmentos de DNA se distinguen fácilmente de los que no lo han hecho. ¿Cómo se identifican estos vectores recombinantes?

3. Clonación de DNA El vector de clonación plasmídico pBR322 (véase la Fig. 9-3) se corta con la endonucleasa de restricción *Pst*I. Un fragmento de DNA aislado de un genoma eucariótico (también producido por corte con *Pst*I) se mezcla y se liga con el vector así preparado. A continuación, la mezcla de DNA ligados se usa para transformar bacterias, y aquellas que contienen plásmidos se seleccionan por crecimiento en presencia de tetraciclina.

(a) Además de los plásmidos recombinantes deseados, ¿qué otros tipos de plásmidos resistentes a la tetraciclina se pueden encontrar en las bacterias transformadas resistentes a la tetraciclina? ¿Cómo pueden distinguirse los diferentes tipos?

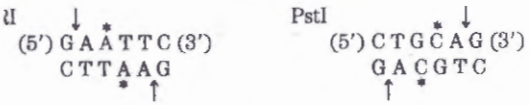
(b) El fragmento de DNA clonado tiene una longitud de 1.000 pb y tiene un sitio de restricción para *Eco*RI a 250 pb de uno de los extremos. Tres plásmidos recombinantes diferentes cortados con *Eco*RI y analizados por electroforesis en gel dieron los patrones mostrados en la figura. ¿Qué información puede obtenerse sobre el DNA clonado a partir de cada patrón? Observe que en el pBR322 los sitios de restricción para *Pst*I y *Eco*RI se encuentran separados por 750 pb. El plásmido entero sin inserto tiene 4.361 pb. Se indica el número de nucleótidos de los fragmentos del marcador de tamaño en el carril 4.



4. Enzimas de restricción La secuencia parcial de una de las cadenas de una molécula de DNA de doble cadena es

- – GACGAAGTGCTGCAGAAAGTCCGCGTTATAGGCAT
TTCCTGAGG – – – 3′

Los sitios de corte para los enzimas de restricción *Eco*RI y *Pst*I se muestran a continuación



Escriba las secuencias de *ambas cadenas* del fragmento de DNA que resultan del corte del DNA con *Eco*RI y *Pst*I. La cadena superior del dúplex debería derivar de la secuencia de la cadena mostrada arriba.

5. Diseño de un ensayo para el diagnóstico de una enfermedad genética La enfermedad de Huntington (EH) es una dolencia neurodegenerativa hereditaria, caracterizada por la pérdida gradual e irreversible de las funciones psicológicas, motoras y cognitivas. Los síntomas generalmente hacen su aparición en la madurez, pero pueden presentarse prácticamente a cualquier edad. El curso de la enfermedad puede prolongarse de 15 a 20 años. Las bases moleculares de la enfermedad son cada vez mejor comprendidas. La mutación genética causante de la EH ha sido localizada

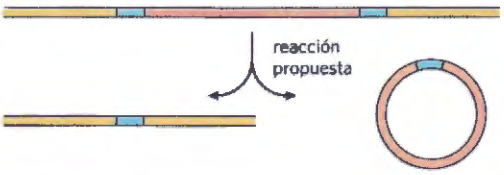
en un gen que codifica una proteína (*Mr* 350.000), cuya función es desconocida. En individuos que no desarrollarán la enfermedad, se encuentra una serie de 6 a 39 codones CAG (para la glutamina), repetidos en tándem en la región que codifica el amino-terminal de la proteína. En los individuos en los que aparece la EH en la madurez este codón está repetido generalmente de 40 a 55 veces. En los casos de aparición en la infancia, este codón está repetido más de 70 veces. La longitud de la repetición del trinucleótido indica si un individuo desarrollará la enfermedad y aproximadamente a qué edad aparecerán los primeros síntomas.

A continuación se muestra una pequeña porción de la secuencia codificante amino terminal del gen de 3.143 codones del gen EH. La secuencia de nucleótidos del DNA se muestra en negro, la secuencia de aminoácidos del gen en azul y la repetición de CAG está sombreada. Con ayuda de la Figura 27-7 para traducir el código genético, proponga un análisis basado en la PCR para el diagnóstico de la EH, que pudiera realizarse con una muestra de sangre. Suponga que el cebador para la PCR tenga 25 nucleótidos. Por convención, salvo indicación contraria, las secuencias codificantes de proteína se representan con la hebra codificante (la secuencia idéntica al mRNA transcrito a partir del gen) arriba, de modo que se lea de 5' a 3', de izquierda a derecha.

```
307 ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC
1   M  A  T  L  E  K  L  M  K  A  F  E  S  L  K  S  F

358 CAGCAGTTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
18  Q  Q  F  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q

409 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCG
36  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  P  P  P  P  P  P  P  P

460 CCGCCTCCTCAGCTTCCTCAGCCGCCGCCG
52  P  P  P  Q  L  P  Q  P  P  P
```

Fuente: The Huntington's Disease Collaborative Research Group, *Cell* 72:971, 1993.

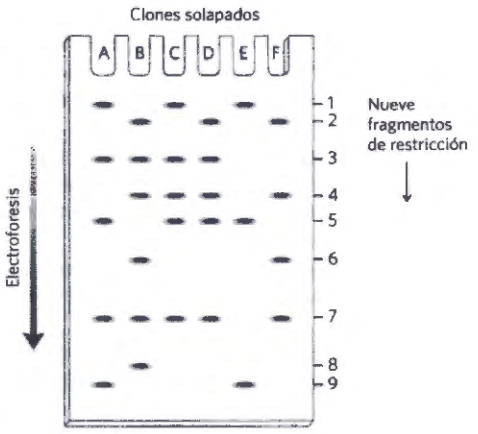
6. Aplicación de la PCR a la detección de moléculas de DNA circulares Ocasionalmente se deleciona un segmento de DNA genómico de un protozoo ciliado. La deleción es una reacción programada genéticamente, asociada al apareamiento celular. Es posible que la deleción resulte de un tipo de recombinación denominada recombinación específica de sitio en la que se empalman los dos extremos del DNA y el DNA delecionado origina un producto circular.



Sugiera de qué modo puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de la forma circular del DNA delecionado en un extracto del protista.

7. Plantas luminosas Una planta modificada para expresar la proteína verde fluorescente plantada en tierra de jardín y regada normalmente brillará en la oscuridad (véase la Fig. 9-16), mientras que una planta modificada para expresar la luciferasa de luciérnaga no lo hará (Fig. 8-36). Explique estas observaciones.

8. Cartografiado de un segmento cromosómico Se aísla un grupo de clones solapados, designados de A a F, de una región de un cromosoma. Se corta cada uno de los clones por separado con un enzima de restricción y los trozos se separan por electroforesis en gel de agarosa, con los resultados que se muestran abajo en la figura. En esta región cromosómica hay nueve fragmentos de restricción distintos, una parte de los cuales está presente en cada clon. A partir de esta información, deduzca el orden de los fragmentos de restricción en el cromosoma.



9. Inmunofluorescencia En el protocolo más común para la detección de proteínas celulares por inmunofluorescencia se usan dos anticuerpos. El primero se une específicamente a la proteína buscada. El segundo se marca con fluoróforos para permitir su visualización, y se une al segundo anticuerpo. En principio se podría simplemente marcar el primer anticuerpo y eliminar un paso. ¿Por qué se usan dos anticuerpos sucesivamente?

10. El análisis del doble híbrido de levadura Se ha descubierto una nueva proteína en un hongo. Diseñe un experimento de doble híbrido en levadura para identificar otras proteínas de la célula fúngica que interaccionen con la proteína estudiada y explique de qué modo esta información podría ayudar a identificar la proteína.

11. Aplicación de la fotolitografía en la producción de chips de DNA La Figura 9-22 muestra los primeros pasos del proceso de elaboración de un chip de DNA mediante fotolitografía. Describa los pasos restantes necesarios para obtener las secuencias deseadas (una secuencia de cuatro nucleótidos diferente en cada uno de los cuatro puntos) mostradas en el primer panel de la figura. Después de cada paso, indique la secuencia nucleotídica resultante unida a cada punto.

12. Uso de los exogrupos en genómica comparada Una proteína hipotética, presente en el orangután, el chimpancé y los humanos, tiene las siguientes secuencias (en rojo se muestran las diferencias de amino ácidos):

Humanos: ATSAAG**Y**DEWEGGK**V**LIHL - - KLQNRGALL ELDIGAV

Orangután: ATSAAG**W**DEWEGGK**V**LIHL**DG**KLQNRGALL ELDIGAV

Chimpancé: ATSAAG**W**DEWEGGK**I**LIHL**DG**KLQNRGALL ELDIGAV

(Los guiones indican una deleción, es decir los residuos ausentes en esta secuencia).

¿Cuál es la secuencia más probable de la proteína presente en el antepasado común del chimpancé y los humanos?

13. Migraciones humanas I Las poblaciones nativas de indios americanos poseen haplotipos que se remontan a poblaciones del noreste de Asia. Las poblaciones Aleut y esquimales de las remotas regiones del norte de Norteamérica poseen un subconjunto de los mismos haplotipos que relacionan a otros nativos americanos con Asia, y además tienen varios haplotipos adicionales de origen asiático, pero que no se encuentran en otras partes de América. Aporte una posible explicación.

14. Migraciones humanas II Se puede encontrar DNA (haplotipos) procedente de los denisovaros en los genomas de los indígenas australianos y en los isleños de Melanesia. Sin embargo, los mismos marcadores del DNA no se encuentran en los genomas de los nativos de Africa. Explíquelo.

15. Búsqueda de genes de enfermedades Se busca la base genética de una rara enfermedad heredada. El examen de seis árboles genealógicos de familias afectadas por la enfermedad suministra resultados inconsistentes. En dos de las familias la enfermedad se hereda con marcadores en el cromosoma 7. En las otras cuatro familias la enfermedad es coheredada con marcadores en el cromosoma 12. ¿Cómo puede suceder esto?

Problema de Análisis de Datos

16. *Hinc*II: La primera endonucleasa de restricción El descubrimiento de la primera endonucleasa de restricción con utilidad práctica se publicó en dos artículos en 1970. En el primer artículo, Smith y Wilcox describieron el aislamiento de un enzima que cortaba el DNA de doble cadena. Inicialmente, demostraron la actividad nucleasa del enzima midiendo la disminución de la viscosidad de muestras de DNA tratadas con el enzima.

(a) ¿Por qué el tratamiento con una nucleasa disminuye la viscosidad de una disolución de DNA?

Los autores determinaron si el enzima era una endo- o una exonucleasa tratando DNA, marcado con ^{32}P, con el enzima y a continuación añadiendo ácido tricloroacético (TCA). En las condiciones usadas en el experimento los nucleótidos individuales eran solubles en TCA y los oligonucleótidos precipitaban.

(b) El tratamiento del DNA marcado con ^{32}P con nucleasa no dio lugar a material marcado con ^{32}P soluble en TCA. Según esto ¿el enzima es una endo- o una exonucleasa? Explique la respuesta.

Cuando se corta un polinucleótido, el fosfato normalmente no es eliminado, sino que permanece unido al extremo 3' o 5' del fragmento de DNA resultante. Smith y Wilcox determinaron la localización del fosfato en el fragmento creado por la nucleasa a través de los siguientes pasos:

1. Trataron DNA no marcado con la nucleasa.
2. Trataron una muestra (A) del producto con γ-^{32}P ATP y polinucleótido quinasa (que puede unir el fosfato γ del ATP al 5' OH, pero no al fosfato 5' o al 3' OH o al fosfato 3'). Midieron la cantidad de ^{32}P incorporado en el DNA.
3. Trataron otra muestra (B) del producto del paso 1 con fosfatasa alcalina (que elimina los grupos fosfato de los extremos 5' y 3' libres) y a continuación con polinucleótido quinasa y γ-^{32}P ATP. Midieron la cantidad de ^{32}P incorporado en el DNA.

(c) Smith y Wilcox encontraron que la muestra A tenía 136 cuentas/min de ^{32}P; la muestra B tenía 3.740 cuentas/min. ¿El corte con la nucleasa dejó el fosfato en el extremo 5' o en el 3' de los fragmentos de DNA? Justifique su respuesta.

(d) El tratamiento del DNA del bacteriófago T7 con la nucleasa dio aproximadamente 40 fragmentos específicos de diversas longitudes. ¿Por qué este resultado está de acuerdo con que el enzima reconozca una secuencia específica en el DNA en lugar de realizar cortes de doble cadena al azar?

Llegados a este punto, todavía hay dos posibilidades para el corte en sitios específicos: (1) que el corte ocurriese en el sitio de reconocimiento o (2) cerca del sitio de reconocimiento, pero no dentro de la secuencia reconocida. Para abordar este aspecto, Kelly and Smith determinaron la secuencia de los extremos 5' de los fragmentos de DNA generados por la nucleasa mediante los siguientes pasos:

1. Trataron el DNA del fago T7 con el enzima.
2. Trataron los fragmentos resultantes con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos en 5'.
3. Trataron los fragmentos desfosforilados con polinucleótido quinasa y ATP marcado con γ-^{32}P para marcar los extremos 5'.
4. Trataron las moléculas marcadas con DNasas para fragmentarlas y obtener una mezcla de mono-, di- y trinucleótidos.
5. Determinaron la secuencia de los mono-, di- y trinucleótidos marcados comparándolos con oligonucleótidos de secuencia conocida por cromatografía en capa fina.

Los productos marcados se identificaron como sigue: mononucleótidos: Ay G; dinucleótidos: (5')-pApA-(3') y (5')-pGpA-(3'); trinucleótidos: (5')pApApC-(3') y (5')-pGpApC-(3').

(e) ¿Qué modelo de corte está de acuerdo con estos resultados? Justifique la respuesta.

Kelly y Smith prosiguieron con la identificación de la secuencia de los extremos 3' de los fragmentos. Encontraron una mezcla de (5')-pTpC-(3') y (5')-pTpT-(3'). No determinaron la secuencia de ningún trinucleótido en el extremo 3'.

(f) Sobre la base de estos datos ¿cuál es la secuencia de reconocimiento de la nucleasa y en qué lugar de la secuencia se corta el DNA? Use la Tabla 9-2 como modelo para su respuesta.

Referencias

Kelly, T.J., and H.O. Smith. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* 51:393–409.

Smith, H.O., and K.W. Wilcox. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51:379–391.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 10

Lípidos

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e..

10.1 Lípidos de almacenamiento 359

10.2 Lípidos estructurales de las membranas 364

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos 372

10.4 Trabajando con lípidos 380

Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua. Las funciones biológicas de los lípidos son tan diversas como su química. En muchos organismos, las grasas y los aceites son las formas principales de almacenamiento energético mientras que los fosfolípidos y los esteroles constituyen los principales elementos estructurales de las membranas biológicas. Otros lípidos, aun estando presentes en cantidades relativamente pequeñas, juegan papeles cruciales como cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, pigmentos que absorben la luz, anclas hidrofóbicas para proteínas, "chaperonas" que ayudan en el plegamiento de las proteínas de membrana, agentes emulsionantes en el tracto digestivo, hormonas y mensajeros intracelulares. Este capítulo describe los lípidos representativos de cada tipo, organizados según sus papeles funcionales, poniendo énfasis en su estructura química y propiedades físicas. Aunque seguimos una organización funcional en la presentación, los, literalmente, miles de lípidos diferentes también se pueden organizar en ocho categorías generales de estructura química (véase la Tabla 10-2). La oxidación de los lípidos productora de energía se trata en el Capítulo 17 y su síntesis en el Capítulo 21.

10.1 Lípidos de almacenamiento

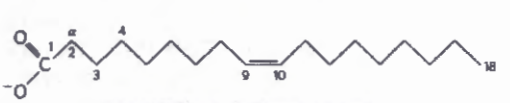
Las grasas y aceites, utilizados casi universalmente como formas de almacenamiento de energía en los organismos vivos, son compuestos derivados de los **ácidos grasos**. Los ácidos grasos son derivados hidrocarbonados con un nivel de oxidación casi tan bajo (esto es, tan reducidos) como el de los hidrocarburos de los combustibles fósiles. La oxidación de los ácidos grasos (a CO_2 y H_2O) en las células, al igual que la oxidación explosiva de los carburantes fósiles en los motores de combustión interna, es muy exergónica.

Introduciremos a continuación la estructura y la nomenclatura de los ácidos grasos que se encuentran con mayor frecuencia en los organismos vivos. Se describen dos tipos de compuestos que contienen ácidos grasos, los triacilgliceroles y las ceras, para ilustrar la diversidad de estructura y las propiedades físicas en esta familia de compuestos.

Los ácidos grasos son derivados de hidrocarburos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos (C_4 a C_{36}). En algunos ácidos grasos, esta cadena está completamente saturada (no tiene dobles enlaces) y sin ramificar; otros contienen uno o más dobles enlaces (Tabla 10-1). Unos cuantos contienen anillos de tres carbonos, grupos hidroxilo o grupos metilo ramificados.

» **Convención Clave:** Una nomenclatura simplificada de ácidos grasos sin ramificar especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces separados por dos puntos. Por ejemplo, el ácido palmítico, que tiene 16 átomos de carbono y es saturado, se abrevia 16:0 y el ácido oleico de 18 carbonos (octadecenoico) con un doble enlace (mostrado abajo) es 18:1. Cada segmento lineal de la estructura en zig-zag representa un enlace sencillo entre carbonos adyacentes. Al carbono carboxílico se le asigna el número 1 (C-1) y al carbono siguiente el C-2. Las posiciones de los distintos dobles enlaces, designados Δ (delta), se especifican en relación a C-1 mediante un exponente que indica el átomo de carbono con número más bajo dentro del doble enlace. Según esta convención, el ácido oleico, con un doble enlace entre C-9 y C-10, se designa 18:1(Δ^9); un ácido graso de 20 carbonos con un doble enlace entre C-9 y C-10 y otro entre C-12 y C-13 se designa 20:2($\Delta^{9,12}$).



18:1(Δ^9) Ácido *cis*-9-octadecenoico

«

TABLA 10-1 Algunos ácidos grasos naturales: estructura, propiedades y nomenclatura

Esqueleto carbonado	Estructura[a]	Nombre sistemático[b]	Nombre común (etimología)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad a 30 °C (mg/g de disolvente)	
					Agua	Benceno
12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Ácido *n*-dodecanoico	Ácido láurico (del latín *laurus*, laurel)	44,2	0,063	2.600
14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Ácido *n*-tetradecanoico	Ácido mirístico (del latín *Myristica*, género de la nuez moscada	53,9	0,024	874
16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Ácido *n*-hexadecanoico	Ácido palmítico (del latín *palma*, palmera)	63,1	0,0083	348
18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Ácido *n*-octadecanoico	Ácido esteárico (del griego, *stear*, grasa dura)	69,6	0,0034	124
20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Ácido *n*-icosanoico	Ácido araquídico (del latín *Arachis*, género de legumbre)	76,5		
24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	Ácido *n*-tetracosanoico	Ácido lignocérico (del latín *lignum*, madera + *cera*, cera)	86,0		
16:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	1 to –0,5		
18:1(Δ^9)	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis*-9-octadecenoico	Ácido oleico (del latín *oleum*, aceite)	13,4		
18:2($\Delta^{9,12}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis-cis*-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico (del griego *linon*, lino)	1–5		
18:3($\Delta^{9,12,15}$)	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	Ácido *cis-cis-cis*-9,12,15-octadecatrienoico	Ácido α-linolénico	–11		
20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	Ácido *cis-cis-cis-cis*-5,8,11,14-icosatetraenoico	Ácido araquidónico	–49,5		

[a]Todos los ácidos se muestran en su forma no ionizada. A pH 7, todos los ácidos grasos libres tienen un carboxilato ionizado. Obsérvese que la numeración de los átomos de carbono empieza en el carbono del grupo carboxílico.

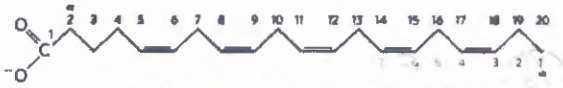
[b]El prefijo *n*- indica la estructura "normal" sin ramificar. Por ejemplo, "dodecanoico" indica simplemente 12 átomos de carbono que se podrían disponer en una serie de formas ramificadas; "*n*-dodecanoico" especifica la forma lineal sin ramificar. En los ácidos grasos insaturados, se indica la configuración de cada uno de los dobles enlaces; en los ácidos grasos biológicos la configuración es casi siempre cis.

Los ácidos grasos más abundantes tienen números pares de átomos de carbono en una cadena sin ramificar de entre 12 y 24 carbonos (Tabla 10-1). Tal como veremos en el Capítulo 21, el número par de carbonos es consecuencia de la forma de síntesis de estos compuestos que utiliza la condensación sucesiva de unidades de de dos carbonos (acetato).

La posición de los dobles enlaces también sigue un patrón regular; en la mayoría de ácidos grasos monoinsaturados el doble enlace se encuentra entre C-9 y C-10 (Δ^9) mientras que los restantes dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados son generalmente Δ^{12} y Δ^{15}. (El ácido araquidónico constituye una excepción a esta generalización; véase la Tabla 10-1). Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados casi nunca son conjugados (alternancia de enlaces dobles y sencillos como en —CH=CH—CH=CH—) sino que están separados por un grupo metileno (—CH=CH—CH_2-CH=CH—).

Los dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos naturales se encuentran en la configuración cis. Los ácidos grasos trans se producen durante la fermentación en el rumen de los animales productores de lácteos y carne.

» **Convención clave:** La familia de **ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)** con un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono desde el extremo metilo de la cadena tienen una importancia especial en la nutrición humana. Debido a que el papel fisiológico de los PUFA está más relacionado con la posición del primer doble enlace desde el extremo *metilo* de la cadena que del extremo carboxilo, se utiliza, a veces, una nomenclatura alternativa para estos ácidos grasos. El carbono del grupo metilo, esto es, el carbono más alejado del grupo carboxílico, se denomina carbono ω (omega; última letra del alfabeto griego) y se le da el número 1 (C-1). En esta convención, el carbono carboxílico tiene el número más elevado se indican en relación al carbono ω. Según esta convención los PUFA con un doble enlace entre C-3 y C-4 se denominan **ácidos grasos omega-3 (ω-3)** y los que tienen un doble enlace entre C-6 y C-7 son los **ácidos grasos omega-6 (ω-6)**. Abajo se muestra el ácido icosapentaenoico, que puede designarse 20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$) según la nomenclatura estándar pero que se conoce como un ácido graso omega-3 al poner el énfasis en el doble enlace biológicamente importante en la posición omega-3. «



20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$) Ácido icosapentaenoico (EPA)

Los humanos requieren el PUFA omega-3 ácido α-linolénico (ALA; 18:3($\Delta^{9,12,15}$) según la convención estándar) pero no tienen la capacidad enzimática para sintetizarlo, por lo que han de obtenerlo a partir de la dieta. A partir del ALA, los humanos pueden sintetizar otros dos PUFA omega-3 que son importantes en la función celular: el ácido icosapentaenoico (EPA; 20:5 ($\Delta^{5,8,11,14,17}$), mostrado en la Convención clave anterior) y el ácido docosahexenoico (DHA; 22:6 ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)). El desequilibrio de los PUFA omega-6 y omega-3 en la dieta está asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. La proporción óptima de PUFA omega-6 a omega-3 en la dieta está entre 1:1 y 4:1, pero la proporción en la dieta de la mayoría de norteamericanos está entre 10:1 y 30:1 aproximadamente. La "dieta mediterránea" que se ha asociado a un riesgo cardiovascular disminuido, es más rica en PUFA omega-3, obtenido de las ensaladas y de los aceites de pescado. Estos últimos son especialmente ricos en EPA y DHA, por lo que se recetan a menudo suplementos de aceites de pescado a los individuos con una historia de enfermedad cardiovascular. ■

Las propiedades físicas de los ácidos grasos y de los compuestos que los contienen vienen determinadas en gran parte por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. La cadena hidrocarbonada apolar explica la escasa solubilidad de los ácidos grasos en agua. El ácido láurico (12:0, M_r 200), por ejemplo, tiene una solubilidad de 0,063 mg/g de agua muy inferior a la de la glucosa (M_r 180) que es de 1.100 mg/g de agua. Cuanto más larga sea la cadena acílica grasa y menor el número de dobles enlaces, menor es la solubilidad en agua. El grupo ácido carboxílico es polar (y está ionizado a pH neutro) lo que justifica la ligera solubilidad en agua de los ácidos grasos de cadena corta.

Los puntos de fusión están también muy influidos por la longitud y grado de saturación de la cadena hidrocarbonada. A temperatura ambiente (25°C), los ácidos grasos saturados desde 12:0 a 24:0 tienen una consistencia cérea, mientras que los ácidos grasos insaturados de estas longitudes son líquidos oleosos. Esta diferencia en los puntos de fusión se debe a los diferentes grados de empaquetamiento de las moléculas de los ácidos grasos **(Fig. 10-1)**. En los compuestos totalmente saturados, la rotación libre alrededor de cada enlace carbono-carbono confiere gran flexibilidad a la cadena hidrocarbonada; la conformación más estable es la forma totalmente extendida, en la que los impedimentos estéricos entre átomos vecinos están reducidos al mínimo. Estas moléculas se pueden empaquetar de forma muy apretada en ordenamientos casi cristalinos con contactos por uniones de van der Waals entre átomos a lo largo de la propia cadena y átomos de cadenas vecinas. En los ácidos grasos insaturados, un doble enlace cis provoca un doblamiento en la cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos con uno o más doblamientos de este tipo no se pueden empaquetar tan fuertemente como los ácidos grasos totalmente saturados, por lo que las interacciones entre ellos son más débiles. Dado que se necesita menos energía térmica para desordenar estos conjuntos poco ordenados de ácidos grasos insaturados, éstos tienen puntos de fusión

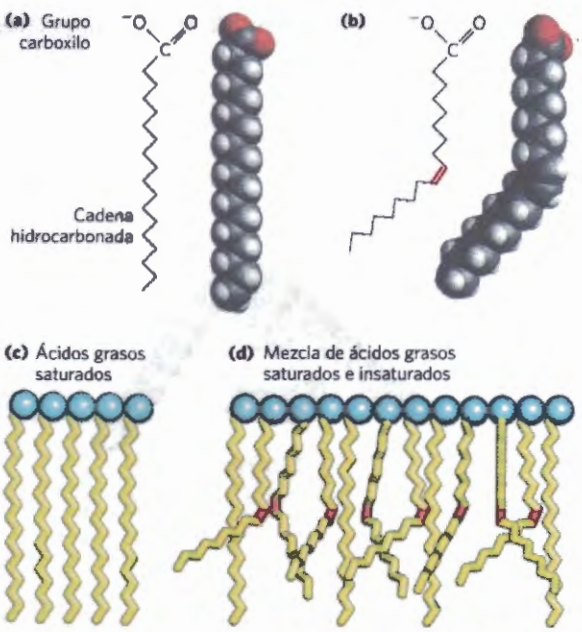


FIGURA 10-1 Empaquetamiento de los ácidos grasos en agregados estables. El grado de empaquetamiento depende de su grado de saturación. **(a)** Dos representaciones del ácido graso saturado, ácido esteárico, 18:0 (estearato a pH 7), se muestran en su conformación normal extendida. **(b)** El doble enlace cis (rojo) del ácido oleico 18:1 (Δ^9) (oleato) no permite la rotación e introduce un giro rígido en la cola hidrocarbonada. Todos los demás enlaces de la cadena pueden rotar libremente. **(c)** Los ácidos grasos totalmente saturados en la forma extendida se empaquetan en ordenamientos casi cristalinos estabilizados por muchas interacciones hidrofóbicas. **(d)** La presencia de uno o más ácidos grasos con dobles enlaces cis (rojo) interfiere con este empaquetamiento apretado dando lugar a agregados menos estables.

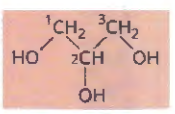
claramente más bajos que los ácidos grasos saturados de la misma longitud de cadena (Tabla 10-1).

En los vertebrados los ácidos grasos libres (ácidos grasos no esterificados, con un grupo carboxilato libre) circulan por la sangre unidos de forma no covalente a una proteína portadora, la albúmina sérica. No obstante, los ácidos grasos en su mayoría se encuentran presentes en el plasma sanguíneo en forma de derivados del ácido carboxílico tales como ésteres o amidas. Al carecer del grupo carboxilato cargado, estos derivados de los ácidos grasos son generalmente aún menos solubles en agua que los ácidos grasos libres.

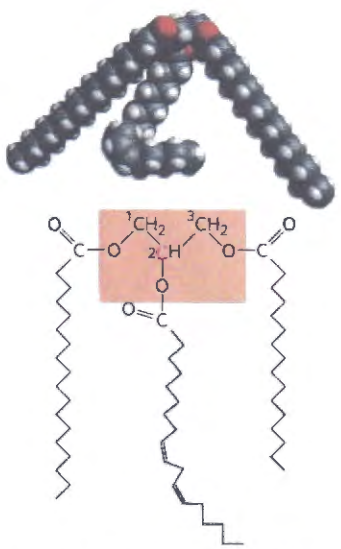
Los triacilgliceroles son ésteres de ácidos grasos y glicerol

Los lípidos más sencillos obtenidos a partir de los ácidos grasos son los **triacilgliceroles**, también denominados triglicéridos, grasas o grasas neutras. Los triacilgliceroles están compuestos de tres ácidos grasos unidos por enlace éster con un solo glicerol **(Fig. 10-2)**. Los que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones se denominan triacilgliceroles simples y se denominan según el ácido graso que contienen. La triestearina, la tripalmitina y la trioleína son, respectivamente, ejemplos de triacilgliceroles sencillos que contienen 16:0, 18:0 y 18:1. La mayoría de los triacilgliceroles naturales son mixtos ya que contienen dos o más ácidos grasos diferentes. Se han de especificar el nombre y posición de cada ácido graso para designar sin ambigüedades estos compuestos.

Dado que los hidroxilos polares del glicerol y los carboxilatos polares de los ácidos grasos están unidos por enlaces éster, los triacilgliceroles son moléculas apolares, hidrofóbicas, prácticamente insolubles en agua. Los lípidos tienen densidades específicas menores que el agua, lo que explica por qué las mezclas de agua y aceite (aceite y vinagre para aliñar la ensalada, por ejemplo) tienen dos fases: el aceite, con menor densidad específica, flota sobre la fase acuosa.



Glicerol



1-Estearil, 2-linoleil, 3-palmitil glicerol, un triacilglicerol mixto

FIGURA 10-2 Glicerol y un triacilglicerol. El triacilglicerol mixto representado en esta figura tiene tres ácidos grasos diferentes unidos al armazón de glicerol. Cuando hay dos ácidos grasos diferentes en C-1 y C-3 del glicerol, el C-2 se transforma en un centro quiral (véase la p. 17).

Los triacilgliceroles aportan energía almacenada aislamiento

En la mayoría de células eucarióticas, los triacilgliceroles *forman una fase separada de gotitas microscópicas oleosas* en el citosol acuoso que sirven como depósito de combustible metabólico. Las células especializadas de los vertebrados, denominadas adipocitos o células grasas, almacenan grandes cantidades de triacilgliceroles en forma de gotitas de grasa que ocupan casi totalmente la célula **(Fig. 10-3a)**. Los triacilgliceroles se almacenan también, en forma de aceite, en las semillas de muchos tipos de plantas, proporcionando energía y precursores biosintéticos durante la germinación de las semillas (Fig. 10-3b). Los adipocitos y las semillas en germinación contienen **lipasas**, enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, liberando ácidos grasos que son exportados a otros lugares donde se requieren como combustible.

En tanto que combustibles almacenados, los triacilgliceroles tienen dos ventajas significativas sobre polisa-

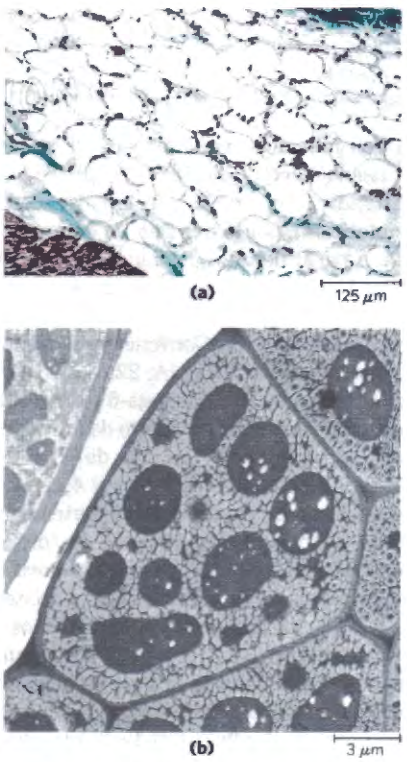


FIGURA 10-3 Almacenes de grasa en las células. **(a)** Sección transversal de tejido adiposo blanco humano. Cada célula contiene una gotícula de grasa (blanco) tan grande que aprieta el núcleo (teñido en rojo) contra la membrana plasmática. **(b)** Sección transversal de una célula de cotiledón de una semilla de la planta *Arabidopsis*. Las grandes estructuras oscuras son cuerpos proteicos que están rodeados por aceites almacenados en los cuerpos oleosos de coloración clara. [Fuentes: (a) Biophoto Associates/Science. (b) Cortesía Howard Goodman. Department of Genetics, Harvard Medical School.]

cáridos tales como el glucógeno o el almidón. En primer lugar los átomos de carbono de los ácidos grasos están más reducidos que los de los azúcares por lo que la oxidación de los triacilgliceroles proporciona más del doble de energía, gramo por gramo, que la de los glúcidos. En segundo lugar, como los triacilgliceroles son hidrofóbicos y, por consiguiente, no hidratados, el organismo que transporta combustible en forma de grasa no ha de transportar el peso adicional del agua de hidratación asociada con los polisacáridos almacenados (2 g por gramo de polisacárido). El tejido graso en los humanos (formado principalmente por adipositos), se encuentra debajo de la piel, en la cavidad abdominal y en las glándulas mamarias. Las personas moderadamente obesas pueden tener de 15 a 20 kg de triacilgliceroles depositados en sus adipocitos, lo que es suficiente para cubrir sus necesidades energéticas durante varios meses solamente con sus depósitos de grasa. Por el contrario, el cuerpo humano no puede almacenar ni las necesidades energéticas de un día en forma de glucógeno. Los glúcidos tales como la glucosa ofrecen ciertas ventajas como fuentes rápidas de energía metabólica siendo una de ellas su fácil solubilidad en agua.

En algunos animales, los triacilgliceroles almacenados debajo de la piel no sólo sirven como almacenes de energía sino como aislamiento contra las bajas temperaturas. Las focas, las morsas, los pingüinos y otros animales polares de sangre caliente están ampliamente protegidos con triacilgliceroles. En los animales hibernantes (por ejemplo, los osos) las enormes reservas de grasa acumuladas antes de la hibernación también tienen una doble misión: aislamiento y depósito de energía (véase el Recuadro 17-1).

La hidrogenación parcial de los aceites de cocina mejora su estabilidad pero produce ácidos grasos con efectos perjudiciales para la salud

La mayoría de grasas naturales tales como los aceites vegetales, los productos lácteos y las grasas animales son mezclas complejas de triacilgliceroles sencillos y mixtos. Estos últimos contienen diversos ácidos grasos que difieren en la longitud de la cadena y grado de saturación **(Fig. 10-4)**. Los aceites vegetales tales como el aceite de maíz y el de oliva están compuestos mayoritariamente por triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados por lo que son líquidos a temperatura ambiente. Los triacilgliceroles que sólo contienen ácidos grasos saturados, tales como la triestearina, componente principal del sebo, son sólidos blancos y grasos a temperatura ambiente.

Cuando los alimentos ricos en grasas se exponen demasiado tiempo al oxígeno del aire se pueden estropear volviéndose rancios. El gusto y olor desagradables asociados con el enranciamiento provienen de la rotura oxidativa de los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados que produce aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena más corta y, por consiguiente, de mayor volatilidad; estos compuestos pasan fácilmente del aire a su nariz. A lo largo del siglo XX para mejorar las condiciones de caducidad de los aceites vegetales utilizados para cocinar y con el fin de aumentar su estabilidad a las altas temperaturas alcanzadas al freir, los aceites vegetales comerciales se someten a hidrogenación parcial. Este proceso

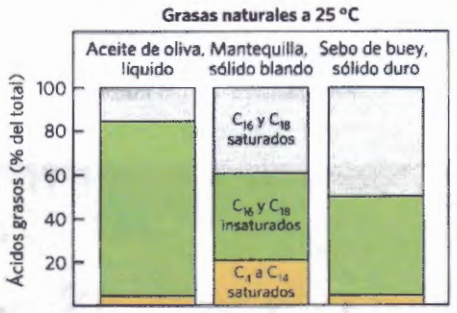
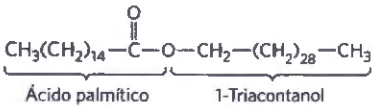


FIGURA 10-4 Composición en ácidos grasos de tres alimentos grasos. El aceite de oliva, la mantequilla y el sebo de buey están formados por mezclas de triacilgliceroles que difieren en su composición de ácidos grasos. Los puntos de fusión de estas grasas, y de aquí su estado físico a temperatura ambiente (25 °C), son función directa de su composición de ácidos grasos. El aceite de oliva tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) que explica su estado líquido a 25 °C. La mayor proporción de ácidos grasos saturados de cadena larga (C_{16} y C_{18}) en la mantequilla incrementa su punto de fusión, por lo que la mantequilla es un sólido blando a temperatura ambiente. El sebo de buey, con una proporción aún mayor de ácidos grasos saturados de cadena larga, es un sólido duro.

convierte gran parte de los dobles enlaces cis de los ácidos grasos en enlaces sencillos lo que aumenta la temperatura de fusión de los aceites por lo que son casi sólidos a temperatura ambiente (la margarina se produce de esta manera a partir de aceites vegetales). La hidrogenación parcial tiene otro efecto, éste indeseable: algunos dobles enlaces cis se convierten en dobles enlaces trans. Actualmente existen muchas pruebas de que la ingestión con la dieta de ácidos grasos trans (a menudo conocidos simplemente como "grasas trans") está en la base de una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares por lo que evitando estas grasas en la dieta reduce el riesgo de enfermedad coronaria. Los ácidos grasos trans de la dieta aumentan la concentración de triacilgliceroles y de colesterol ligado a LDL (colesterol "malo") en la sangre al tiempo que disminuyen la concentración de colesterol ligado a HDL (colesterol "bueno"), cambios que por sí solos son suficientes para aumentar el riesgo de enfermedad coronaria. Los ácidos grasos trans aún pueden tener más efectos adversos. Parece que, por ejemplo, aumentan la respuesta inflamatoria corporal, lo cual es otro riesgo de enfermedad cardíaca. (Véase el Capítulo 21 para una descripción del colesterol LDL y HDL –lipoproteína de baja densidad y lipoproteína de alta densidad– y sus efectos sobre la salud). Agencias reguladoras en todo el mundo en la actualidad regulan o prohiben la utilización de ácidos grasos trans en los alimentos preparados y empaquetados. ■

Las ceras sirven como almacenes de energía y como cubiertas impermeables al agua

Las ceras biológicas son ésteres de ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados (C14 a C36) con alcoholes de cadena larga (C16 a C30) **(Fig. 10-5)**. Sus puntos de fusión (60 a 100 °C) son generalmente más elevados que los de los triacilgliceroles. En el plancton, constituido por microorganismos marinos flotantes de vida libre que se encuentran en la base de la cadena alimenticia para los animales marinos, las ceras son la



(a)



(b)

FIGURA 10-5 Cera biológica. **(a)** El triacontanilpalmitato, componente mayoritario de la cera de abeja, es un éster del ácido palmítico con el alcohol triacontanol. **(b)** Un panal, construido con cera de abeja, es rígido a 25 °C y totalmente impermeable al agua. [Fuente: (b) iStockphoto/Thinkstock.]

forma de almacenamiento principal de combustible metabólico.

Las ceras también realizan diversas funciones, que están relacionadas con sus propiedades repelentes del agua y con su consistencia firme. Ciertas glándulas de la piel de los vertebrados secretan ceras para proteger el pelo y la piel manteniéndolos flexibles, lubricados e impermeables. Las aves, especialmente las acuáticas, secretan ceras que mantienen la impermeabilidad de sus plumas. Las hojas brillantes del acebo, rododendros, hiedra venenosa y muchas plantas tropicales están recubiertas con una espesa capa de ceras que las protege contra parásitos e impide la evaporación excesiva del agua.

Las ceras biológicas tienen diversas aplicaciones en las industrias farmacéutica, cosmética y otras. La lanolina (de la lana de oveja), la cera de abeja (Fig. 10-5), la cera de carnauba (de una palmera brasileña) y la cera extraida de las semillas de jojoba se utilizan ampliamente en la fabricación de lociones, ungüentos y pulimentos.

RESUMEN 10.1 Lípidos de almacenamiento

- Los lípidos son componentes celulares insolubles en agua y de estructuras diversas que se pueden extraer de los tejidos con disolventes apolares.
- Casi todos los ácidos grasos, que proporcionan el componente hidrocarbonado de los lípidos, tienen un número par (generalmente 12 a 24) de átomos de carbono y pueden ser saturados o insaturados; los dobles enlaces tienen casi siempre la configuración cis.
- Los triacilgliceroles contienen tres moléculas de ácido graso esterificadas con los tres grupos hidroxilo del glicerol. Los triacilgliceroles sencillos contienen un solo tipo de ácido graso; los triacilgliceroles mixtos contienen dos o tres tipos diferentes. Los triacilgliceroles son mayoritariamente grasas de almacenamiento; se encuentran en muchos tipos de alimentos.
- Debido a que los ácidos grasos trans de la dieta son un factor de riesgo importante en la enfermedad coronaria, se ha regulado minuciosamente su utilización en alimentos preparados i empaquetados.
- Las ceras son ésteres de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes de cadena larga.

10.2 Lípidos estructurales de las membranas

La característica arquitectónica central de las membranas biológicas es una doble capa lipídica que constituye una barrera al paso de moléculas polares y de iones. Los lípidos de las membranas son anfipáticos; un extremo de la molécula es hidrofóbico y el otro hidrofílico. Sus

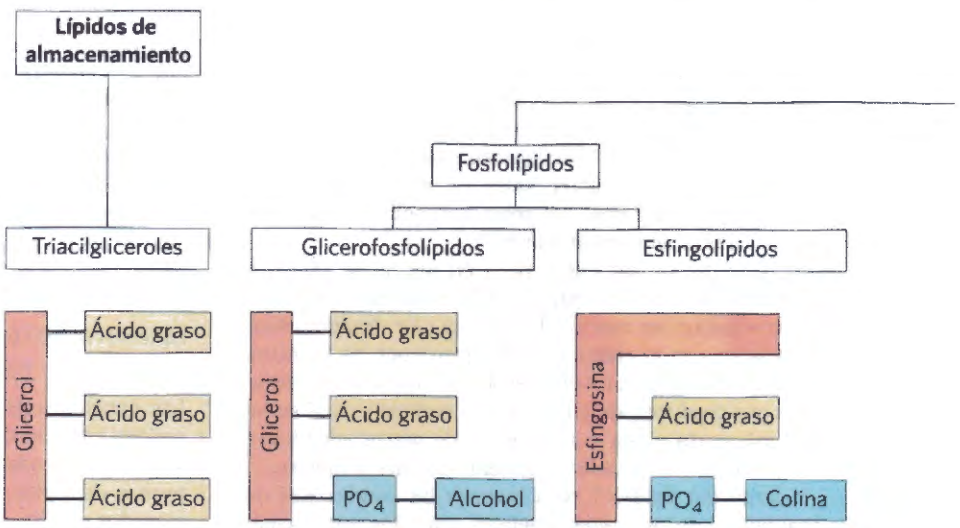


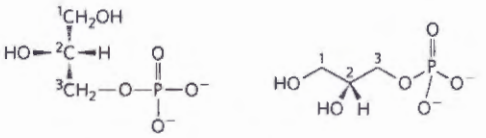
FIGURA 10-6 Algunos tipos comunes de lípidos de almacenamiento y de membrana. Todos los tipos de lípidos que se muestran tienen como armazón el glicerol o la esfingosina (recuadros rosas) al que se unen uno o más grupos alquilo de cadena larga (amarillo) y un grupo polar de cabeza (azul). En los triacilgliceroles, glicerofosfolípidos, galactolípidos y sulfolípidos, los grupos alquilo son ácidos grasos en enlace éster. Los esfingolípidos contienen un solo ácido graso formando

interacciones hidrofóbicas entre ellos y las hidrofílicas con el agua dirigen su empaquetamiento hacia la formación de láminas llamadas bicapas membranosas. En esta sección se describen cinco tipos generales de lípidos de membrana: glicerofosfolípidos, en los que las regiones hidrofóbicas están compuestas por dos ácidos grasos unidos al glicerol; galactolípidos y sulfolípidos que también tienen dos ácidos grasos esterificados con el glicerol pero que carecen del fosfato característico de los fosfolípidos; lípidos tetraéter de las arquebacterias, en los que dos cadenas alquílicas muy largas están unidas mediante enlace éter al glicerol de ambos extremos; esfingolípidos, en los que se une un solo ácido graso a una amina grasa, la esfingosina; y esteroles, que son compuestos que se caracterizan por tener un sistema rígido de cuatro anillos hidrocarbonados fusionados.

Las partes hidrofílicas de estos compuestos anfipáticos pueden ser muy sencillas, por ejemplo un simple grupo —OH en un extremo del sistema anular de los esteroles, o pueden ser mucho más complejas. Los glicerofosfolípidos y algunos esfingolípidos contienen un grupo polar que se une a una porción hidrofóbica mediante un enlace fosfodiéster; son los **fosfolípidos**. Otros esfingolípidos carecen de grupo fosfato pero tienen un azúcar sencillo u oligosacáridos complejos en sus extremos polares; son los **glucolípidos** **(Fig. 10-6)**. Dentro de estas clases de lípidos de membrana se produce una enorme diversidad debido a las diferentes combinaciones de "colas" de ácidos grasos y "cabezas" polares. El ordenamiento de estos lípidos en las membranas y sus papeles estructurales y funcionales en las mismas se tratan en el capítulo siguiente.

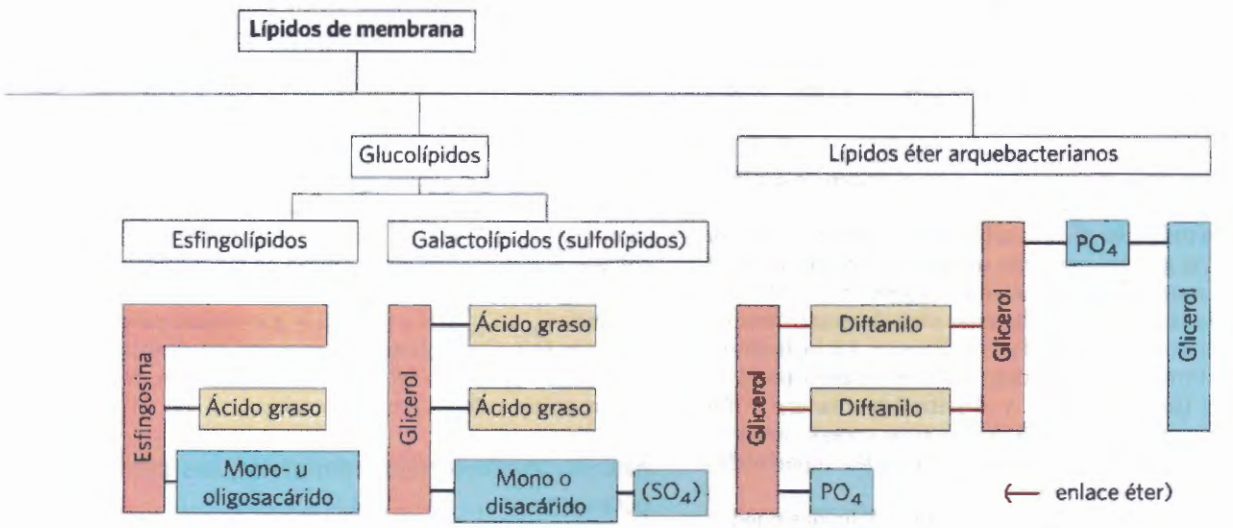
Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico

Los **glicerofosfolípidos**, también llamados fosfoglicéridos, son lípidos de membrana en los que dos ácidos grasos están unidos por enlace éster al primer y segundo carbonos del glicerol y un grupo de cabeza muy polar o cargado está unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono. El glicerol es proquiral; no tiene carbonos asimétricos pero la unión del fosfato a cualquiera de los dos extremos lo convierte en un compuesto quiral que se denomina correctamente L-glicerol 3-fosfato o D-glicerol 1-fosfato o *sn*-glicerol 3-fosfato **(Fig. 10-7)**. Los glicerofosfolípidos, como derivados del ácido fosfatídico **(Fig. 10-8)**, se nombran según el alcohol polar en el grupo de cabeza. Por ejemplo, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina tienen colina y etanolamina en sus grupos polares de cabeza. La cardiolipina es un glicerofosfolípido de dos colas en el que dos porciones de ácido fosfatídico comparten el mismo glicerol como grupo de cabeza (Fig. 10-8). La cardiolipina se encuentra en la mayoría de membranas bacterianas; en las células eucarióticas la cardiolipina se localiza de forma casi exclusiva en la membrana mitocondrial interna (en donde se sintetiza), localización consistente con la



L-Glicerol 3-fosfato (*sn*-glicerol 3-fosfato)

FIGURA 10-7 El L-Glicerol 3-fosfato, armazón de los fosfolípidos. El glicerol en sí no es quiral ya que tiene un plano de simetría a través del C-2. Sin embargo, el glicerol es proquiral, ya que puede convertirse en un compuesto quiral al añadir un sustituyente tal como el fosfato a cualquiera de los dos grupos —CH2OH. Una nomenclatura sin ambigüedades para el glicerol fosfato es el sistema DL (descrito en la p. 78), en el que los isómeros se nombran según su relación estereoquímica con los isómeros del gliceraldehído. Según este sistema el estereoisómero del glicerol fosfato que se encuentra en la mayoría de lípidos se nombra correctamente como L-glicerol 3-fosfato o como D-glicerol 1-fosfato. Otra manera de especificar los estereoisómeros es el sistema *sn* (numeración estereoespecífica) en el que C-1 es, por definición, el grupo del compuesto proquiral que ocupa la posición pro-S. La forma común del glicerol fosfato en los fosfolípidos es, según este sistema, *sn*-glicerol 3-fosfato (en el que C-2 tiene la configuración R). En las arquebacterias, el glicerol de los lípidos tiene la otra configuración; es el D-glicerol 3-fosfato.



enlace amida con el armazón de esfingosina. Los lípidos de membrana de las arquebacterias son variables; el que se muestra aquí tiene dos cadenas alquilo muy largas y ramificadas con sus dos extremos formando un enlace éter con una porción de glicerol. En los fosfolípidos, el grupo polar de cabeza está unido a través de un enlace fosfodiéster, mientras que los glucolípidos tienen una unión glucosídica directa entre el azúcar del grupo de cabeza y el armazón de glicerol.

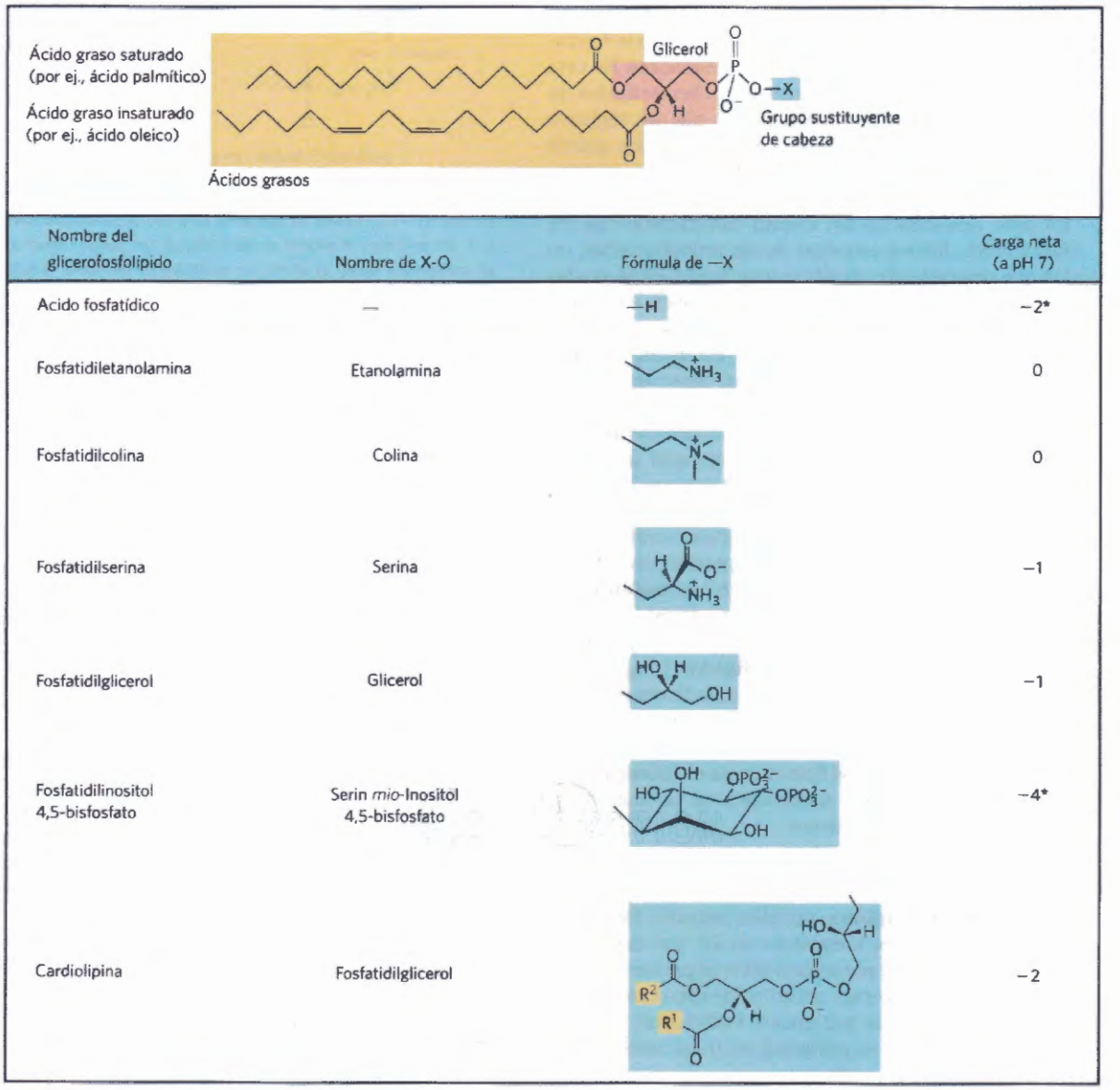


FIGURA 10-8 Glicerofosfolípidos. Los glicerofosfolípidos comunes son diacilgliceroles unidos a alcoholes del grupo de cabeza mediante un enlace fosfodiéster. El ácido fosfatídico, un fosfomonoéster, es el compuesto de referencia. Cada derivado se denomina según el alcohol del grupo de cabeza (X), con el prefijo "fosfatidil-". En la cardiolipina, un solo glicerol es compartido por dos ácidos fosfatídicos (R^1 y R^2 son grupos acilo graso). *Observe que los ésteres fosfato del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato tienen cada uno una carga de alrededor de −1,5; uno de sus grupos —OH sólo está parcialmente ionizado a pH 7.

hipótesis de la endosimbiosis para el origen de orgánulos (véase la Fig. 1-40).

En todos los glicerofosfolípidos, el grupo de cabeza se une al glicerol mediante un enlace fosfodiéster en el que el grupo fosfato tiene una carga negativa a pH neutro. El alcohol polar puede estar cargado negativamente (tal como sucede en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), ser neutro (fosfatidilserina) o estar cargado positivamente (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Tal como se verá en el Capítulo 11, estas cargas contribuyen significativamente a las propiedades superficiales de las membranas.

Los ácidos grasos de los glicerofosfolípidos pueden ser muy variados, por lo que un fosfolípido dado (fosfatidilcolina, por ejemplo) puede estar formado por diversas especies moleculares, cada una con una dotación singular de ácidos grasos. La distribución de las especies moleculares es específica de los distintos organismos, diferentes tejidos de un mismo organismo y distintos glicerofosfolípidos en la misma célula o tejido. En general, los glicerofosfolípidos contienen un ácido graso saturado C_{16} o C_{18} en C-1 y un ácido graso insaturado C_{18} o C_{20} en C-2. Con algunas excepciones, se desconoce todavía el significado biológico de la variación de los ácidos grasos y de los grupos de cabeza.

Algunos glicerofosfolípidos tienen ácidos grasos unidos por enlace éter

Algunos tejidos animales y algunos organismos unicelulares son ricos en **lípidos con función éter**, en los que una de las dos cadenas acilo está unida al glicerol con

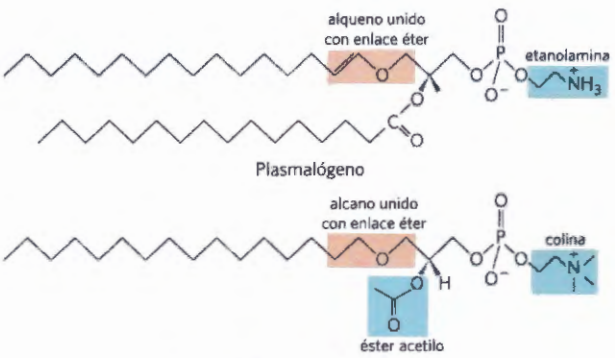


FIGURA 10-9 Lípidos con enlaces tipo éter. Los plasmalógenos tienen una cadena alquenílica unida por enlace éter en donde la mayoría de los glicerofosfolípidos tienen un ácido graso unido en enlace éster (compárese con la Fig. 10-8). El factor activador plaquetario tiene una cadena alquílica larga unida por enlace éter al C-1 del glicerol, pero el C-2 está unido por enlace éster al ácido acético, lo que hace que el compuesto sea mucho más hidrosoluble que la mayoría de glicerofosfolípidos y plasmalógenos. El alcohol del grupo de cabeza es la etanolamina en los plasmalógenos y la colina en el factor activador de las plaquetas.

enlace éter en lugar de enlace éster. La cadena unida por enlace éter puede ser saturada, tal como sucede en los lípidos alquílicos con función éter, o puede contener un doble enlace entre C-1 y C-2 tal como sucede en los **plasmalógenos** (**Fig. 10-9**). El tejido cardíaco de los vertebrados es único en su riqueza de lípidos con función éter; alrededor de la mitad de los fosfolípidos cardíacos son plasmalógenos. Las membranas de las bacterias halófilas, de los protistas ciliados y de ciertos invertebrados también contienen elevadas proporciones de lípidos con función éter. No se conoce su significación funcional en estas membranas; quizás su resistencia a las fosfolipasas que cortan ácidos grasos unidos por enlace éster de los lípidos de las membranas sea importante en algunos papeles.

Hay al menos un lípido con función éter, el **factor activador plaquetario** que es una molécula señal importante. Se libera de leucocitos denominados basófilos y estimula la agregación de las plaquetas y la liberación de serotonina (un vasoconstrictor) contenida en las mismas. Ejerce también diversos efectos sobre el hígado, músculo liso, corazón, tejidos uterino y pulmonar y juega un papel importante en la inflamación y en la respuesta alérgica. ■

Los cloroplastos contienen galactolípidos y sulfolípidos

El segundo grupo de lípidos de membrana son los que predominan en las células vegetales; los **galactolípidos,** en los que uno o dos residuos galactosa están unidos por enlace glucosídico con el C-3 de un 1,2-diacilglicerol (**Fig. 10-10**; véase también la Fig. 10-6). Los galactolípidos están localizados en las membranas tilacoides (membranas internas) de los cloroplastos; constituyen del 70 al 80% de los lípidos totales de membrana en las plantas vasculares. Son, probablemente, los lípidos de membrana más abundantes en la biosfera. El fosfato es, a menudo, el nutriente del suelo limitante para la planta por lo que, quizás, la presión evolutiva para conservar el fosfato para papeles más críticos favoreció el que las plantas fabriquen lípidos sin fosfato. Las membranas vegetales también contienen sulfolípidos, en los que un residuo de glucosa sulfonado se une a un diacilglicerol mediante enlace glucosídico. El sulfonato es portador de una carga negativa lo mismo que el grupo fosfato de los fosfolípidos.

Las arquebacterias contienen lípidos de membrana singulares

Algunas arquebacterias que viven en nichos ecológicos con condiciones extremas: altas temperaturas (agua hirviente), bajo pH o alta fuerza iónica, por ejemplo, tienen lípidos de membrana que contienen hidrocarburos ramificados de cadena larga (32 carbonos) unidos en cada extremo al glicerol (**Fig. 10-11**). Estas uniones son a través de enlaces éter que son mucho más estables a la hidrólisis a pH bajo y elevada temperatura que los enlaces éster que se encuentran en los lípidos de las

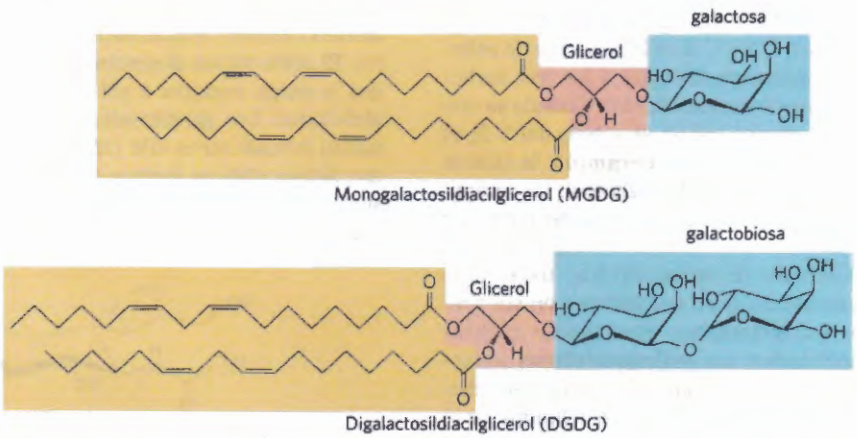


FIGURA 10-10 Dos galactolípidos de las membranas tilacoides de los cloroplastos. En los monogalactosildiacilgliceroles (MGDG) y en los digalactosildiacilgliceroles (DGDG) los dos grupos acilo son poliinsaturados y los grupos de cabeza no tienen carga.

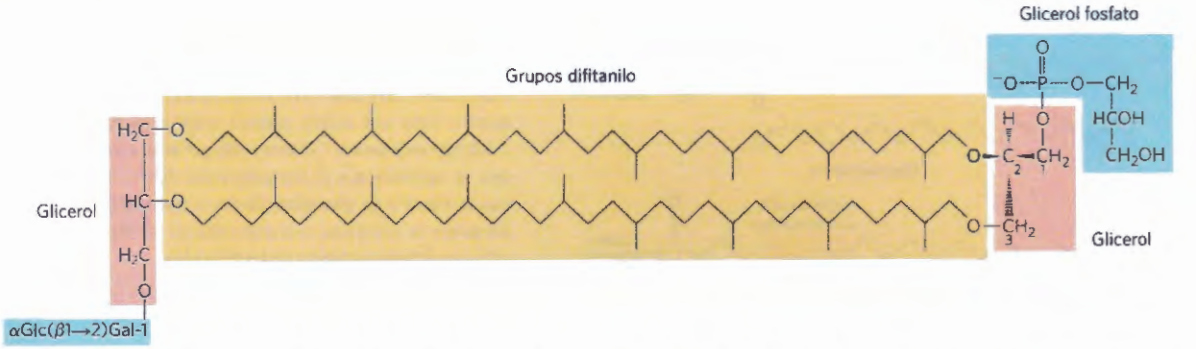


FIGURA 10-11 Lípido de membrana inusual que sólo se encuentra en arquebacterias. En este lípido difitanil tetraéter, las porciones difitanilo (amarillo) son hidrocarburos largos compuestos por ocho grupos isopreno de cinco carbonos condensados cabeza-ccabeza (sobre la condensación de las unidades de isopreno véase la Figura 21-36; compare también los grupos diftanilo con la cadena lateral de fitol de 20 carbonos presente en las clorofilas mostradas en la Fig. 20-8a). En esta forma extendida, los grupos diftanilo tienen aproximadamente el doble de longitud que un ácido graso de 16 carbonos típico de los lípidos de membrana de las bacterias y eucariotas. Las porciones glicerol de los lípidos arquebacterianos tienen la configuración R a diferencia de los de bacterias y eucariotas que tienen la configuración S. Los lípidos de las arquebacterias difieren en los sustituyentes de los gliceroles. En la molécula aquí mostrada, un glicerol está unido al disacárido α-glucopiranosil-(1→2)-β-galactofuranosa; el otro glicerol está unido a un grupo de cabeza glicerol fosfato.

bacterias y de los eucariotas. En su forma totalmente extendida, estos lípidos arquebacterianos tienen una longitud doble de la de los fosfolípidos y esfingolípidos y abarcan todo el grosor de la membrana plasmática. A cada extremo de la molécula extendida hay una cabeza polar que consiste en glicerol unido a residuos fosfato o azúcar. El nombre general de estos compuestos, glicerol dialquil glicerol tetraéteres (GDGT) refleja su estructura única y singular. La porción glicerol de los lípidos arquebacterianos no es el mismo estereoisómero que el de los lípidos de bacterias y eucariotas; el carbono central se encuentra en la configuración R en las arquebacterias y en la S en bacterias y eucariotas (Fig. 10-7).

Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina

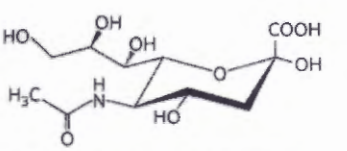
Los **esfingolípidos**, la cuarta clase importante de lípidos de membrana, también tienen un grupo de cabeza polar y dos colas apolares pero, a diferencia de los glicerofosfolípidos y galactolípidos no contienen glicerol. Los esfingolípidos están compuestos por una molécula del aminoalcohol de cadena larga esfingosina (también llamado4-esfingenina) o uno de sus derivados, una molécula de un ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar unido por enlace glucosídico, en algunos casos, y por enlace fosfodiéster en otros **(Fig. 10-12)**.

Los carbonos C-1, C-2 y C-3 de la molécula de esfingosina son estructuralmente análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. Cuando se une un ácido graso por enlace amida al $—NH_2$ del C-2, el compuesto que se obtiene es una **ceramida**, la cual es similar estructuralmente a un diacilglicerol. La ceramida es la unidad estructural fundamental de todos los esfingolípidos.

Hay tres subclases de esfingolípidos, todas ellas derivadas de la ceramida, pero que difieren en sus grupos de cabeza: esfingomielinas, glucolípidos neutros (sin carga) y gangliósidos. Las **esfingomielinas** contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar por lo que se clasifican como fosfolípidos junto con los glicerofosfolípidos (Fig. 10-6). Las esfingomielinas se parecen, por supuesto, a las fosfatidilcolinas en sus propiedades generales y en su estructura tridimensional y también por no tener carga neta en sus grupos de cabeza polares **(Fig. 10-13)**. Las esfingomielinas se hallan presentes en las membranas plasmáticas de las células animales y son especialmente abundantes en la vaina de mielina que rodea y aisla los axones de algunas neuronas, de ahí el nombre "esfingomielinas".

Los **glucoesfingolípidos**, que se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana plasmática, tienen uno o más azúcares en su grupo de cabeza conectados directamente al —OH en C-1 de la porción ceramida; no contienen fosfato. Los **cerebrósidos** tienen un único azúcar unido a la ceramida; los que contienen galactosa se encuentran de manera característica en las membranas plasmáticas de células del tejido nervioso mientras que las que contienen glucosa se hallan en las membranas plasmáticas de células de tejidos no nerviosos. Los **globósidos** son glucoesfingolípidos con dos o más azúcares, normalmente D-glucosa, D-galactosa o *N*-acetil-D-galactosamina. Dado que no tienen carga a pH 7, los cerebrósidos y los globósidos se denominan a veces **glucolípidos neutros**.

Los **gangliósidos** son los esfingolípidos más complejos. Contienen grupos de cabeza polares formados por oligosacáridos y uno o varios residuos de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), un ácido siálico (a menudo llamado simplemente "ácido siálico"), terminales. El ácido siálico desprotonado aporta a los gangliósidos la carga negativa a pH 7 que los distingue de los globósidos. Los gangliósidos con un residuo de ácido siálico forman series GM (*M* de mono-), los que tienen dos ácidos siálicos forman series GD (*D*- de di-) y así sucesivamente (GT, tres residuos de ácido siálico; GQ, cuatro).



α-Ácido *N*-acetil neuramínico (un ácido siálico) (Neu5Ac)



Johann Thudichum, 1829–1901
[Fuente: J. L. W. Thudichum, Tubingen, F. Pietzcker (1898).]

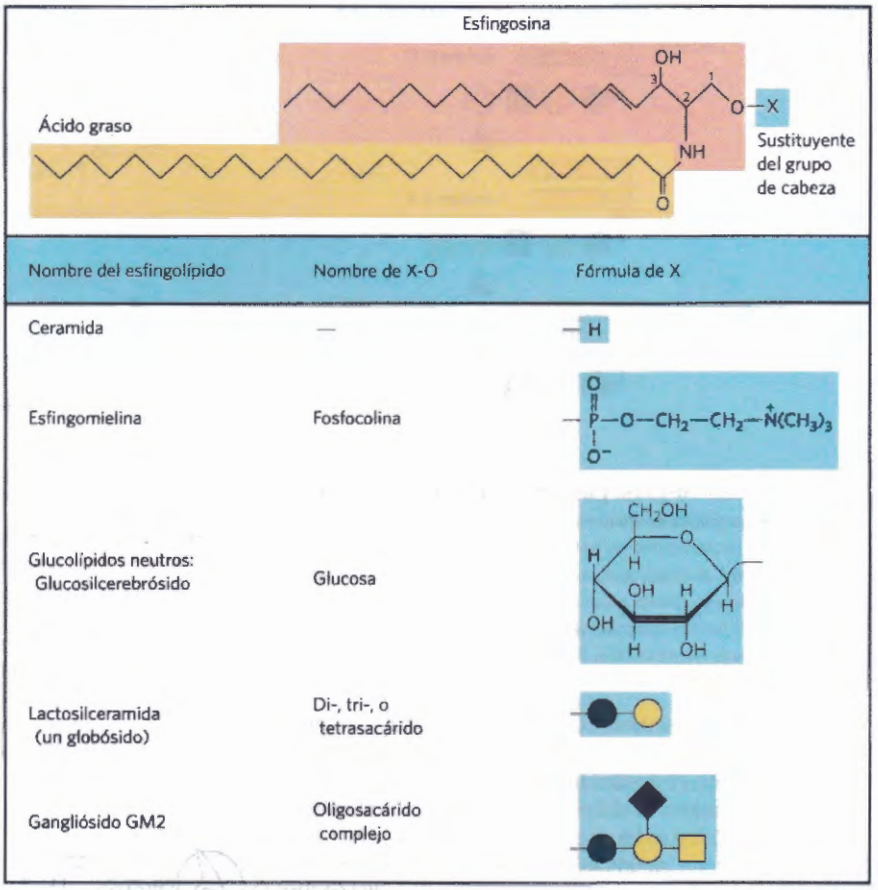


FIGURA 10-12 Esfingolípidos. Los tres primeros carbonos del extremo polar de la esfingosina son análogos a los tres carbonos del glicerol en los glicerofosfolípidos. El grupo amino en C-2 lleva un ácido graso unido por enlace amida. El ácido graso es habitualmente saturado o monoinsaturado y contiene 16, 18, 22 o 24 átomos de carbono. La ceramida es el compuesto de referencia de este grupo. Otros esfingolípidos difieren en el grupo polar de cabeza (X) unido a C-1. Los gangliósidos tienen grupos de cabeza oligosacáridos muy complejos. En esta figura se utilizan los símbolos estándar de los glúcidos tal como se muestran en la Tabla 7-1.

Los esfingolípidos de la superfície celular son sitios de reconocimiento biológico

Cuando hace más de un siglo el físico-químico Johann Thudichum descubrió los esfingolípidos, su papel biológico parecía tan enigmático como la Esfinge, por lo que los bautizó de este modo. En la especie humana, se han identificado al menos 60 esfingolípidos diferentes en las membranas celulares. Muchos de ellos desempeñan un papel especialmente importante en las membranas plasmáticas de neuronas y algunos de ellos constituyen claramente sitios de reconocimiento en la superficie celular pero sólo se ha descubierto la función específica de unos pocos esfingolípidos. La porción glucídica de ciertos esfingolípidos define los grupos sanguíneos humanos y, por tanto, determina el tipo de sangre que los individuos pueden recibir de manera segura en las transfusiones sanguíneas **(Fig. 10-14)**.

Los gangliósidos se concentran en la cara externa de las membranas polasmáticas, en la superficie exterior de las células, en donde presentan puntos de reconocimiento para moléculas extracelulares o superfi-

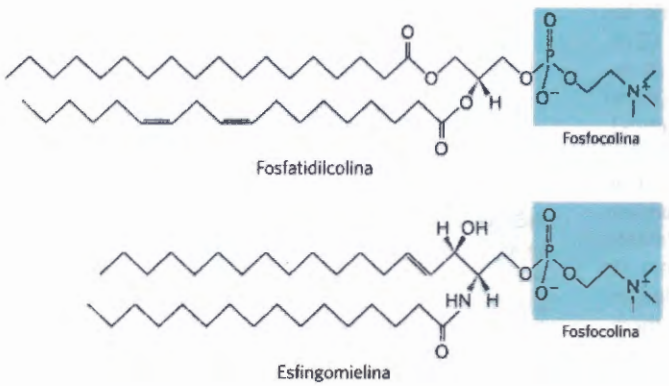


FIGURA 10-13 Las estructuras moleculares similares de dos tipos de lípidos de membrana. La fosfatidilcolina (glicerofosfolípido) y la esfingomielina (esfingolípido) tienen dimensiones y propiedades físicas similares pero, probablemente, juegan papeles diferentes en las membranas.

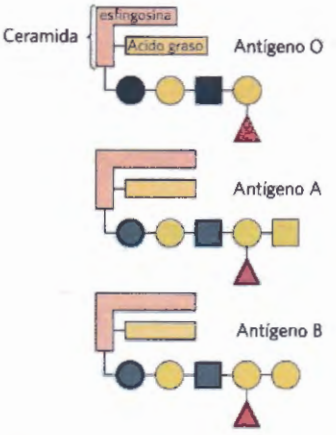


FIGURA 10-14 Los glucoesfingolípidos como determinantes de los grupos sanguíneos. Los grupos sanguíneos humanos (O, A, B) vienen determinados en parte por los grupos de cabeza oligosacáridos de estos glucoesfingolípidos. Los mismos tres oligosacáridos se encuentran también unidos a ciertas proteínas sanguíneas de individuos de los tipos O, A y B, respectivamente. Se utilizan los símbolos estándar para los azúcares (véase la Tabla 7-1).

cies de células vecinas. Los tipos y cantidades de gangliósidos en la membrana plasmática cambian drásticamente durante el desarrollo embrionario. La formación de tumores induce la síntesis de un nuevo complemento de gangliósidos y se ha encontrado que concentraciones muy bajas de un gangliósido específico inducen la diferenciación de células neuronales tumorales en cultivo. El síndrome de Guillain-Barré es una enfermedad autoinmune grave en la que el cuerpo produce anticuerpos contra sus propios gangliósidos, incluidos los de las neuronas. La inflamación resultante daña el sistema nervioso periférico, lo que conduce a una parálisis temporal (o a veces permanente). En el cólera, la toxina del cólera producida por la bacteria intestinal *Vibrio cholerae* entra en el interior de células sensibles después de unirse a gangliósidos específicos situados en la superficie de las células epiteliales del intestino (véase el Recuadro 12-1). El papel biológico de diversos gangliósidos continúa siendo un terreno fecundo para futuras investigaciones. ■

Los fosfolípidos y los esfingolípidos se degradan en los lisosomas

La mayoría de células degradan y reemplazan continuamente sus lípidos de membrana. En los lisosomas existe un enzima hidrolítico específico para cada uno de los enlaces hidrolizables de un glicerofosfolípido **(Fig. 10-15)**. Las fosfolipasas del tipo A eliminan uno de los dos ácidos grasos produciendo un lisofosfolípido. (Estas esterasas no atacan el enlace éter de los plasmalógenos). Las lisofosfolipasas eliminan el ácido graso restante.

Los gangliósidos se degradan por un conjunto de enzimas lisosómicos que catalizan la eliminación secuencial de las unidades de azúcar, produciendo finalmente una ceramida. Un defecto genético en cualquiera de estos enzimas hidrolíticos lleva a la acumulación de gangliósidos en la célula, lo cual tiene consecuencias médicas importantes (Recuadro 10-1).

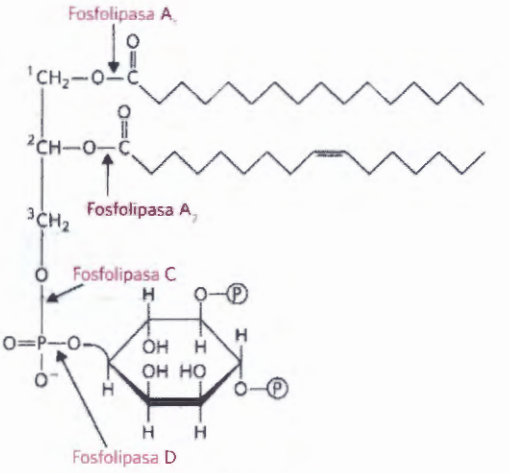


FIGURA 10-15 Especificidad de las fosfolipasas. Las fosfolipasas A1 y A2 hidrolizan los enlaces éster de glicerofosfolípidos intactos en C-1 y C-2 del glicerol, respectivamente. Cuando se ha eliminado uno de los ácidos grasos por una fosfolipasa de tipo A, el segundo ácido graso es eliminado de la molécula por una lisofosfolipasa (no se muestra en la figura). Las fosfolipasas C y D rompen cada una de ellas uno de los enlaces fosfodiéster del grupo de cabeza. Algunas fosfolipasas actúan solamente sobre un tipo de glicerofosfolípido, tal como el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2 que se muestra aquí) o la fosfatidilcolina; otras son menos específicas.

Los esteroles tienen cuatro anillos hidrocarbonados fusionados

Los **esteroles** son lípidos estructurales que se hallan presentes en la membrana de la mayoría de células eucarióticas. La estructura característica de este quinto grupo de lípidos de membrana es la del núcleo esteroide que consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco **(Fig. 10-16)**. El núcleo esteroide es casi plano y relativamente rígido; los anillos fusionados no permiten la rotación alrededor de los enlaces C—C. El **colesterol** es el principal esterol en los tejidos animales, es anfipático, con un grupo de cabeza polar (el grupo hidroxilo en C-3) y un cuerpo hidrocarbonado apolar (el núcleo esteroide y la cadena lateral hidrocarbonada en C-17) que es casi tan largo como un ácido graso de 16 carbonos en su forma extendida. En otros eucariotas se encuentran esteroles similares: por

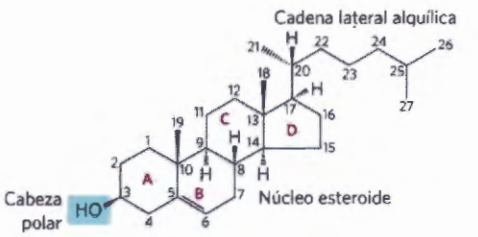


FIGURA 10-16 Colesterol. En esta estructura química del colesterol, los anillos se marcan de A a D, para simplificar la referencia a los derivados del núcleo esteroide; los átomos de carbono se numeran en azul. El grupo hidroxilo en C-3 (sombreado en azul) es el grupo polar de cabeza. Para el almacenamiento y transporte del esterol, este grupo hidroxilo se condensa con un ácido graso formando un éster de esteroi.

RECUADRO 10-1 MEDICINA Acumulación anormal de lípidos de membrana: algunas enfermedades genéticas humanas

Los lípidos polares de las membranas experimentan un recambio metabólico constante en el que la velocidad de su síntesis está normalmente contrarrestada por una velocidad de degradación igual. La degradación de los lípidos se consigue mediante enzimas hidrolíticos de los lisosomas con capacidad para hidrolizar un enlace específico cada uno de ellos. Cuando la degradación de esfingolípidos está alterada por un defecto en uno de estos enzimas (Fig. 1), los productos de la degradación parcial se acumulan en los tejidos, causando una enfermedad grave. Se han descubierto más de 50 enfermedades de almacenamiento lisosomal, siendo todas ellas resultado de una sola mutación en uno de los genes de una proteína lisosomal.

Por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick está causada por un defecto genético raro en el enzima esfingomielinasa que corta la fosfocolina de la esfingomielina. La esfingomielina se acumula en el cerebro, bazo e hígado. La enfermedad aparece en los lactantes y produce retraso mental y muerte temprana. Mucho más frecuente es la enfermedad de Tay-Sachs en la que se acumula el ganglióside GM2 en el cerebro y en el bazo(Fig. 2) debido a la falta del enzima hexosaminidasa A. Los síntomas de la enfermedad de Tay-Sachs son retraso progresivo del crecimiento, parálisis, ceguera y muerte a los 3 ó 4 años de edad.

El consejo genético puede predecir y evitar muchas enfermedades genéticas. Se han diseñado pruebas para detectar enzimas anormales en los futuros padres y, seguidamente, pruebas de DNA pueden determinar la naturaleza exacta del defecto y el riesgo que significa para la descendencia. Una vez producido el embarazo, se pueden hacer pruebas similares sobre células fetales tomando una muestra de una parte de la placenta (biopsia coriónica) o del líquido que rodea el feto (amniocentesis).

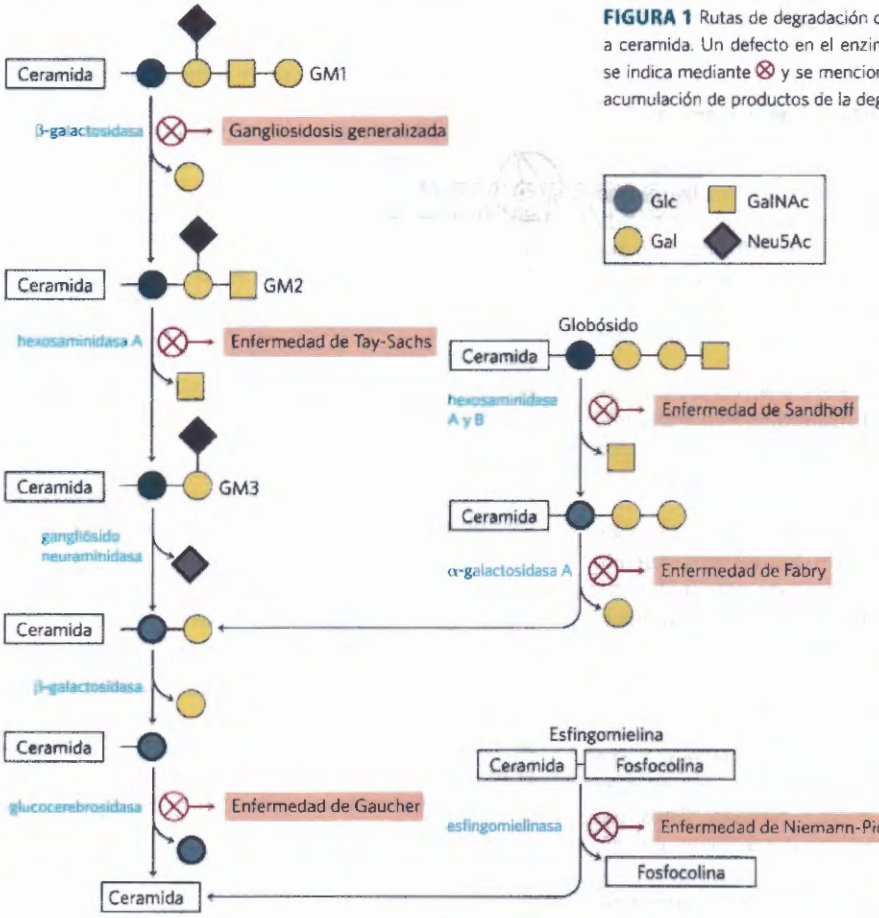


FIGURA 1 Rutas de degradación de GM_1, globósido y esfingomielina a ceramida. Un defecto en el enzima que hidroliza un paso concreto se indica mediante ⊗ y se menciona la enfermedad que resulta de la acumulación de productos de la degradación parcial.

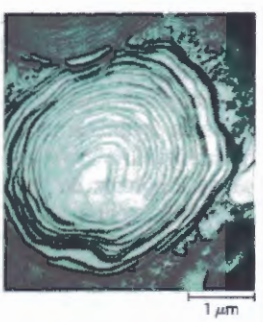
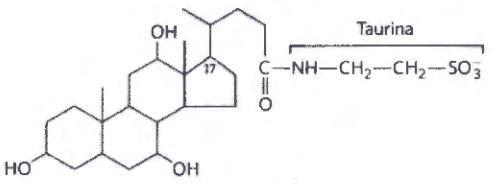


FIGURA 2 Micrografía electrónica de una porción de una célula cerebral de un lactante con la enfermedad de Tay-Sachs, obtenida post mortem, en la que se muestran los depósitos anormales de gangliósidos en los lisosomas. [Fuente: Otis Imboden/National Geographic/Getty Images.]

ejemplo, el estigmasterol en plantas y el ergosterol en hongos. Las bacterias no pueden sintetizar esteroles; no obstante, unas pocas especies bacterianas pueden incorporar esteroles exógenos en sus membranas. Los esteroles de todos los eucariotas se sintetizan a partir de subunidades sencillas de isopreno de cinco carbonos, lo mismo que las vitaminas liposolubles, las quinonas y los dolicoles que se describen en la Sección 10.3.

Además de su papel como constituyentes de las membranas, los esteroles son los precursores de diversos productos con actividades biológicas específicas. Las hormonas esteroides, por ejemplo, son potentes señales biológicas que regulan la expresión génica. Los **ácidos biliares** son derivados polares del colesterol que actúan como detergentes en el intestino emulsionando las grasas de la dieta para hacerlas más fácilmente accesibles a las lipasas digestivas.



Ácido taurocólico
(un ácido biliar)

Volveremos al colesterol y a otros esteroles en capítulos posteriores para considerar la función estructural del colesterol en las membranas biológicas (Capítulo 11), la señalización por las hormonas esteroides (Capítulo 12) y la notable ruta biosintética del colesterol y su transporte por lipoproteínas transportadoras (Capítulo 21).

RESUMEN 10.2 Lípidos estructurales de las membranas

- Los lípidos polares, que tienen cabezas polares y colas apolares, son componentes principales de las membranas. Los más abundantes son los glicerofosfolípidos que contienen ácidos grasos esterificados con dos grupos hidroxilo del glicerol y un segundo alcohol, el grupo de cabeza, esterificado con el tercer hidroxilo del glicerol a través de un enlace fosfodiéster. Otros lípidos polares son los esteroles.
- Los glicerofosfolípidos se diferencian en la estructura de su grupo de cabeza; la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina son glicerofosfolípidos comunes. Las cabezas polares de los glicerofosfolípidos están cargadas a pH cercano a 7.
- Las membranas de los cloroplastos son ricas en galactolípidos, compuestos por un diacilglicerol con uno o dos residuos de galactosa unidos y en sulfolípidos que son diacilgliceroles con un residuo glucídico sulfonado y, por tanto, con un grupo de cabeza cargado negativamente.
- Algunas arquebacterias tienen lípidos de membrana singulares con grupos alquilo de cadena larga unidos por enlace éter con glicerol en ambos extremos y con residuos glucídicos y/o fosfato unidos al glicerol para formar un grupo de cabeza polar o cargado. Estos lípidos son estables en las drásticas condiciones en que viven las arquebacterias.
- Los esfingolípidos contienen esfingosina que es un aminoalcohol alifático de cadena larga, pero no glicerol. La esfingomielina tiene, además del ácido fosfórico y la colina, dos cadenas hidrocarbonadas largas, una de ellas aportada por un ácido graso y la otra por la esfingosina. Las otras tres clases de esfingolípidos son los cerebrósidos, los globósidos y los gangliósidos que contienen diversos componentes glucídicos.
- Los esteroles tienen cuatro anillos fusionados y un grupo hidroxilo. El colesterol es el principal esterol en los animales y es, a la vez, un componente estructural de las membranas y un precursor de muchos esteroides.

10.3 Lípidos como señales, cofactores y pigmentos

Las dos clases funcionales de lípidos consideradas hasta el momento (lípidos de almacenamiento y lípidos estructurales) son componentes celulares mayoritarios; los lípidos de las membranas representan del 5 al 10% de la masa seca de muchas células y los lípidos de almacenamiento más del 80% de la masa de un adipocito. Si bien hay algunas excepciones importantes, estos lípidos juegan un papel *pasivo* en la célula; los combustibles lipídicos están almacenados hasta que son oxidados por enzimas y los lípidos de membrana forman barreras impermeables que separan las células y los compartimientos celulares. Hay otro grupo de lípidos que aunque son componentes celulares relativamente minoritarios tienen papeles *activos* en el tráfico metabólico en tanto que metabolitos y mensajeros. Algunos son señales potentes, tales como las hormonas transportadas en la sangre desde un tejido a otro, o como los mensajeros intracelulares generados en respuesta a una señal extracelular (hormona o factor de crecimiento). Otros funcionan como cofactores enzimáticos en reacciones de transferencia de electrones en cloroplastos y mitocondrias o en la transferencia de porciones de azúcar en un gran número de reacciones de glucosilación. Un tercer grupo consiste en lípidos con un sistema de doble enlaces conjugados: moléculas de pigmentos que absorben luz visible. Algunos de éstos actúan como pigmentos que captan la luz en la visión y en la fotosíntesis; otros producen coloraciones naturales tales como el color anaranjado de calabazas y zanahorias y el amarillo de las plumas de canario. Finalmente, un grupo muy extenso de lípidos volátiles producidos en las plantas actúan de señal a través del aire, permitiendo que las plantas se comuniquen entre sí; también son útiles para invitar animales amigos y disuadir enemigos. En esta sección describiremos algunos de estos lípidos biológicamente activos. En capítulos posteriores se considerarán más detalladamente su síntesis y actividades biológicas.

Los fosfatidilinositoles y algunos derivados de la esfingosina actúan como señales intracelulares

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados actúan a varios niveles para la regulación de la estructura y el metabolismo celulares. El fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2; Fig. 10-15) en el lado citoplásmico (interior) de las membranas plasmáticas sirve como depósito de moléculas mensajeras que se liberan en el interior de la célula como respuesta a señales extracelulares que interaccionan con receptores específicos de la superficie. Las señales extracelulares, tales como la hormona vasopresina activan una fosfolipasa C específica en la membrana, la cual hidroliza el PIP_2, liberando dos productos que actúan como mensajeros intracelulares: inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3), que es hidrosoluble, y diacilglicerol, que permanece asociado con la membrana plasmática. El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático.

La combinación del diacilglicerol y del aumento de Ca^{2+} citosólico activa el enzima proteína quinasa C. Mediante la fosforilación de proteínas específicas este enzima desencadena la respuesta celular a la señal extracelular. Este mecanismo de señalización se describe de manera más detallada en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12-11).

Los fosfolípidos de inositol también actúan como puntos de nucleación para algunos complejos supramoleculares que intervienen en la señalización o en la exocitosis. Diversas proteínas de señalización se unen específicamente al fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3) en la membrana plasmática lo que inicia la formación de complejos multienzimáticos en la superficie citosólica de la membrana. Así, la formación del PIP_3 en respuesta a señales extracelulares agrupa las proteínas en complejos de señalización en la superficie de la membrana plasmática (véase la Fig. 12-20).

Los esfingolípidos de membrana actúan también como fuente de mensajeros intracelulares. Tanto las ceramidas como la esfingomielina (Fig. 10-12) son potentes reguladores de las proteína quinasas y se sabe que la ceramida o sus derivados intervienen en la regulación de la división celular, diferenciación, migración y muerte celular programada (también denominada apoptosis; véase el Capítulo 12).

Los icosanoides son portadores de mensajes a las células vecinas

Los icosanoides son hormonas paracrinas, sustancias que actúan sólo en las células próximas al punto de síntesis de la hormona en lugar de ser transportadas por la sangre para actuar en células de otros tejidos u órganos. Estos derivados de ácidos grasos tienen una diversidad de efectos extremadamente potentes sobre tejidos de vertebrados. Intervienen en la función reproductora; en la inflamación, fiebre y dolor asociados a las lesiones o enfermedades; en la formación de coágulos de sangre y en la regulación de la presión sanguínea; en la secreción gástrica ácida y en diversos procesos importantes en la salud o enfermedad humanas.

Todos los icosanoides proceden del araquidonato (ácido araquidónico; 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)) y del ácido icosapentaenoico (EPA; 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$)), del que toman su nombre general (del griego *eikosi*, "veinte"). Hay cuatro clases principales de icosanoides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas **(Fig. 10-17).** Los nombres de los icosanoides incluyen letras que designan los grupos funcionales del anillo y números que indican el número de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada.

Las **prostaglandinas (PG)** contienen un anillo de cinco átomos de carbono. Su nombre proviene de la glándula prostática, primer tejido del que fueron aisladas por Bengt Samuelsson y Sune Bergström. La PGE2 y otras protaglandinas de la serie 2 se sintetizan a partir del araquidonato; las prostaglandinas de la serie 3 provienen del EPA (véase la Fig. 21-12) Las prostaglandinas tienen funciones diversas. Algunas estimulan la contracción del músculo liso del útero durante el parto o en la menstruación. Otras afectan el flujo sanguíneo a órganos específicos, al ciclo sueño-vigilia y a la capacidad de respuesta de ciertos tejidos a hormonas tales como la adrenalina y el glucagón. Prostaglandinas de un tercer grupo elevan la temperatura corporal (dando lugar a fiebre) y causan inflamación y dolor.

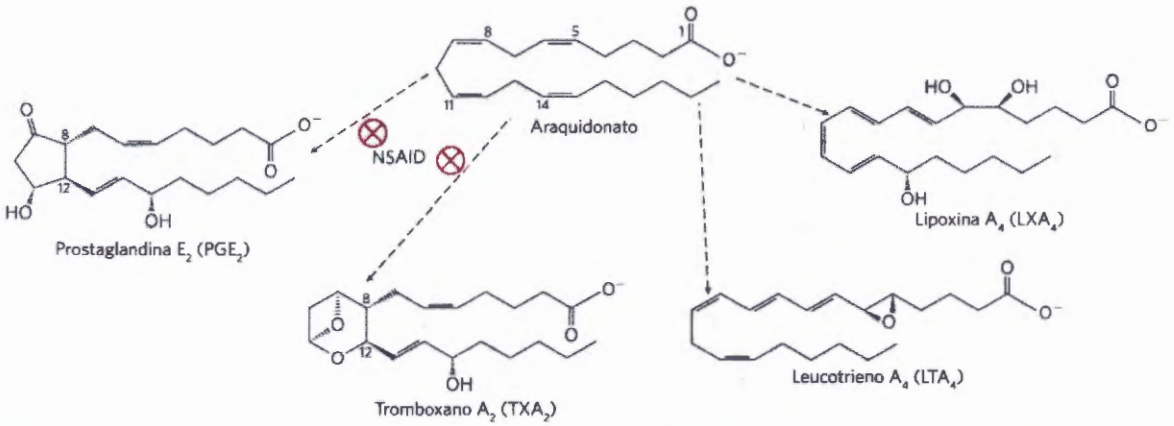


FIGURA 10-17 Ácido araquidónico y algunos de sus derivados icosanoides. El ácido araquidónico (araquidonato a pH 7) es el precursor de icosanoides tales como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En la prostaglandina PGE_2, el C-8 y C-12 del araquidonato están unidos formando el característico anillo de cinco átomos. En el tromboxano A_2, el C-8 y C-12 están unidos y se añade un átomo de oxígeno para formar un anillo hexagonal. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID), tales como la aspirina y el ibuprofeno bloquean la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del araquidonato mediante la inhibición del enzima ciclooxigenasa (prostaglandina H_2 sintasa). El leucotrieno A_4 contiene una serie de tres dobles enlaces conjugados y una porción no cíclica. Las lipoxinas también son derivados acíclicos del araquidonato y contienen varios grupos hidroxilo



John Vane (1927–2004), Sune Bergström (1916–2004), and Bengt Samuelsson [Fuente: Ira Wyman/Sygma/Corbis.]

Los **tromboxanos (TX)** tienen un anillo de seis átomos que contiene una función éter. Son producidos por las plaquetas (también llamadas trombocitos) y actúan en la formación de coágulos sanguíneos y en la reducción del flujo sanguíneo hacia el sitio de un coágulo. Según demostró John Vane, los antiinflamatorios no esteroides (NSAID) –aspirina, ibuprofeno y meclofenamato, por ejemplo, inhiben el enzima prostaglandina H2 sintasa (también llamado ciclooxigenasa2 o COX–2), que cataliza uno de los primeros pasos en la ruta del araquidonato a prostaglandinas de la serie 2 y tromboxanos (véase la Figura 21-12).

Los **leucotrienos (LT)**, encontrados por primera vez en los leucocitos, contienen tres dobles enlaces conjugados. Son señales biológicas potentes. Por ejemplo, el leucotrieno D4, derivado del leucotrieno A4, induce la contracción del músculo liso que recubre las vías aéreas del pulmón. La sobreproducción de leucotrienos produce ataques asmáticos por lo que su síntesis constituye una de las dianas de medicamentos antiasmáticos tales como la prednisona. La fuerte contracción de los músculos lisos del pulmón que tiene lugar en el shock anafiláctico es parte de la reacción alérgica, potencialmente fatal, en individuos hipersensibles a las picadas de abeja, penicilina y a otros agentes.

Las **lipoxinas (LX)**, al igual que los leucotrienos, son icosanoides lineales. Su característica distintiva es la presencia de varios grupos hidroxilo a lo largo de la cadena (Fig. 10-17). Estos compuestos son potentes agentes antiinflamatorios. Debido a que su síntesis está estimulada por dosis bajas (81 mg) de aspirina tomadas diariamente, esta baja dosis se prescribe frecuentemente a individuos con enfermedad cardiovascular. ■

Las hormonas esteroides transportan mensajes entre tejidos

Los esteroides son derivados oxidados de los esteroles; poseen el núcleo del esterol pero carecen de la cadena alquílica unida al anillo D del colesterol y, por ello, son más polares que el colesterol. Las hormonas esteroides se desplazan a través del torrente circulatorio (en proteínas transportadoras) desde el sitio de producción hasta los tejidos diana, donde entran en las células, se unen a proteínas receptoras altamente específicas en el núcleo, y provocan cambios en la expresión génica y, por consiguiente, en el metabolismo. Dada la elevadísima afinidad de los receptores hacia la hormona, son suficientes concentraciones muy bajas de hormona (nanomolar o inferior) para producir el efecto sobre los tejidos diana. Los principales grupos de hormonas esteroides son las hormonas sexuales masculinas y femeninas y las hormonas de la corteza suprarrenal, el cortisol y la aldosterona **(Fig. 10-18)**. Prednisona y prednisolona son medicamentos esteroides con potentes actividades antiinflamatorias gracias, en parte, a la inhibición de la liberación del ácido araquidónico por la fosfolipasa A_2 y la consiguiente inhibición de la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas. Existe una amplia variedad de aplicaciones médicas de estos medicamentos, entre las que se incluye el tratamiento del asma y de la artritis reumatoide. ■

Las plantas vasculares contienen brasinólido, de tipo esteroide (Fig. 10-18), que es un potente regulador del crecimiento al aumentar la velocidad de alargamiento de los tallos y afectar la orientación de las microfibrillas de celulosa de la pared celular durante el crecimiento.

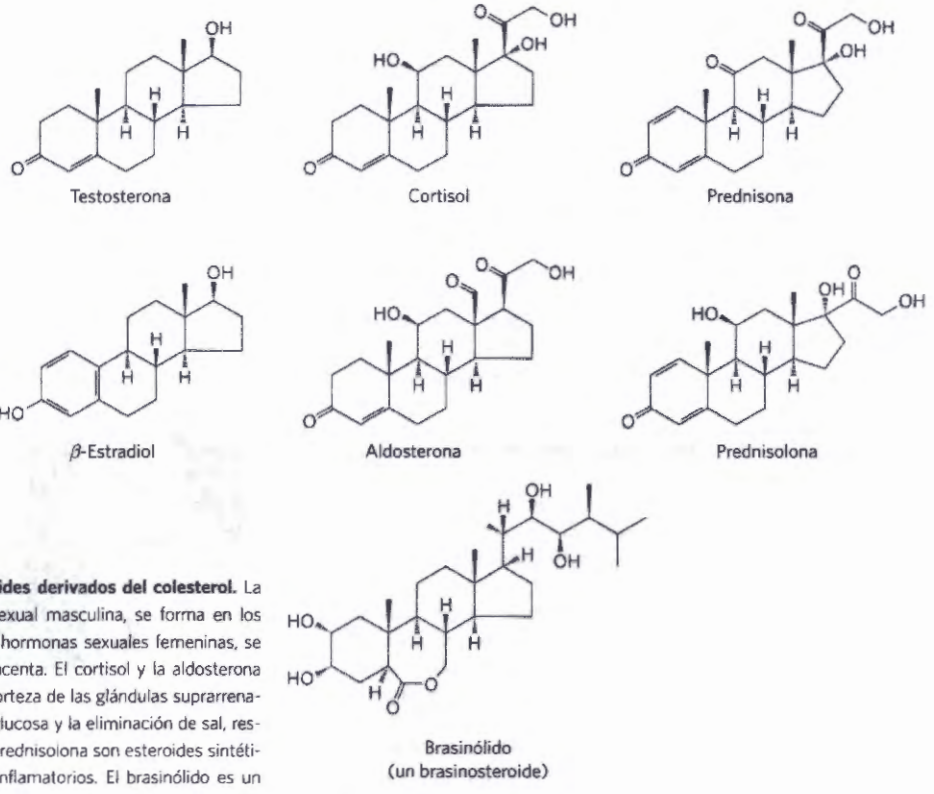
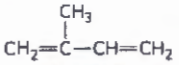


FIGURA 10-18 Esteroides derivados del colesterol. La testosterona, hormona sexual masculina, se forma en los testículos. El estradiol, una de las hormonas sexuales femeninas, se produce en los ovarios y en la placenta. El cortisol y la aldosterona son hormonas sintetizadas en la corteza de las glándulas suprarrenales; regulan el metabolismo de la glucosa y la eliminación de sal, respectivamente. La prednisona y la prednisolona son esteroides sintéticos utilizados como agentes antiinflamatorios. El brasinólido es un regulador del crecimiento que se encuentra en las plantas vasculares.

Las plantas vasculares producen millares de señales volátiles

Las plantas producen millares de compuestos lipofílicos diferentes, sustancias volátiles que utilizan para atraer polinadores, repeler herbívoros, atraer organismos que defienden las plantas contra herbívoros y para comunicarse con otras plantas. Por ejemplo, el jasmonato, procedente del ácido graso 18:3($\Delta^{9,12,15}$) que se encuentra en los lípidos de las membranas pone en marcha las defensas de la planta en respuesta a las lesiones causadas por insectos. El éster metílico del jasmonato confiere el aroma característico del aceite de jazmín profusamente utilizado en la industria de perfumería. Gran parte de las sustancias volátiles de las plantas, entre ellas el geraniol (que da el olor característico de los geranios), el β-pineno (de los pinos), el limoneno (limas), mentol y carvona (véase la Fig. 1-25a), provienen de ácidos grasos o de compuestos formados por la condensación de unidades de isopreno de cinco carbonos.



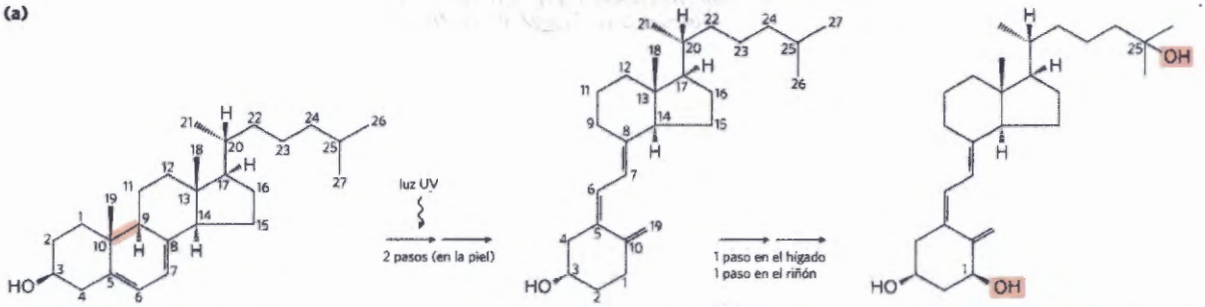
Isopreno

Las vitaminas A y D son precursores hormonales

Durante las primeras décadas del siglo XX un foco importante de investigación en la química fisiológica fue la identificación de las **vitaminas**, compuestos esenciales para la salud del ser humano y otros vertebrados que no pueden ser sintetizados por estos animales, motivo por el cual deben ser obtenidos de la dieta. En los primeros estudios nutricionales se identificaron dos clases generales de este tipo de compuestos: los que eran solubles en disolventes orgánicos apolares (vitaminas liposolubles) y los que se podían extraer de los alimentos con disolventes acuosos (vitaminas hidrosolubles). En último término, el grupo liposoluble se resolvió en los cuatro grupos de vitaminas A, D, E y K, todas ellas compuestos isoprenoides sintetizados por condensación de múltiples unidades de isopreno. Dos de estos grupos (D y A) son precursores hormonales.

La **vitamina D_3**, también llamada **colecalciferol**, se forma normalmente en la piel a partir de 7-deshidrocolesterol mediante una reacción fotoquímica accionada por el componente ultravioleta de la luz solar **(Fig. 10-19a)**. La vitamina D_3, por sí misma, no es biológicamente activa pero enzimas del hígado y los riñones convierten este precursosr en el 1α,25-dihidroxivitamina D_3 (calcitriol), hormona que regula la captación de calcio en el intestino y las concentraciones del calcio en el riñón y en los huesos. La deficiencia de vitamina D conduce a la formación defectuosa de los huesos propia de la enfermedad del raquitismo, que se cura de forma espectacular con la administración de vitamina D (Fig. 10-19b). La vitamina D_2 (ergocalciferol) es un producto comercial formado por la irradiación UV del ergosterol de la levadura. La vitamina D_2 es similar estructuralmente a la D_3, con una pequeña modificación en la

(a)



7-Deshidrocolesterol — Colecalciferol (Vitamina D_3) — 1α,25-Dihidroxivitamina D_3 (calcitriol)

FIGURA 10-19 Producción y metabolismo de la vitamina D_3. **(a)** El colecalciferol (vitamina D_3) se produce en la piel por irradiación UV del 7-deshidrocolesterol, que rompe el enlace sombreado en rosa. En el hígado, se añade un grupo hidroxilo en C-25; en el riñón, una segunda hidroxilación en C-1 produce la hormona activa, 1α,25-dihidroxivitamina D_3. Esta hormona regula el metabolismo del Ca^{2+} en los riñones, intestino y huesos. **(b)** La vitamina D de la dieta evita el raquitismo, enfermedad que fue común en climas fríos en los que la ropa de abrigo abundante bloqueaba el componente UV de la luz solar necesario para la producción de vitamina D_3 por la piel. En este detalle, parte de un gran mural, obra de John Steuart Curry, *The Social Benefits of Biochemical Research* (1943), las personas y los animales a la izquierda muestran los efectos de la nutrición deficiente entre las que se observan las piernas arqueadas de un niño con raquitismo clásico. A la derecha se encuentran personas y animales más sanos gracias a "los beneficios sociales de la invesigación", entre los que se incluyen la utilización de la vitamina D para la prevención y tratamiento del raquitismo. [Fuente: (b) Cortesía de Media Center, University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry.]

(b)



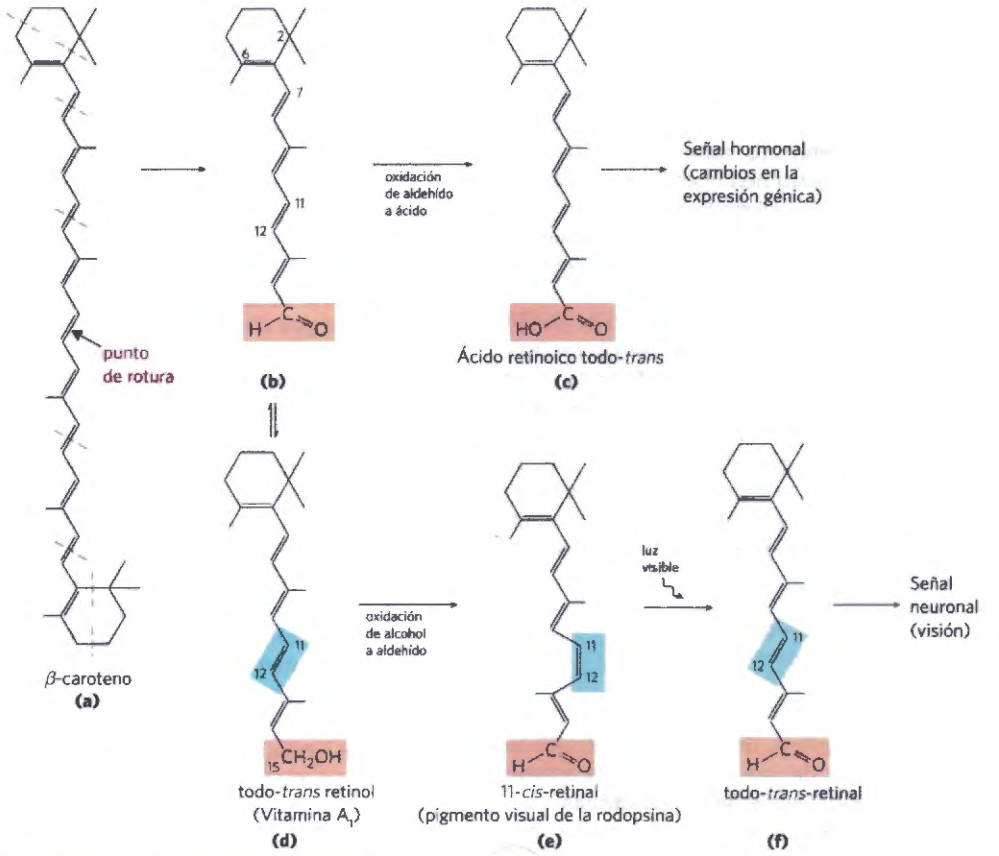


FIGURA 10-20 Vitamina A_1 sus precursores y derivados. **(a)** El β-caroteno se muestra con sus unidades estructurales de isopreno marcadas mediante líneas de trazos rojas. La rotura simétrica del β-caroteno produce dos moléculas de todo-*trans*-retinal. **(b)** que se puede seguir oxidando hasta ácido retinoico todo-*trans*, una hormona retinoide **(c)** o se reduce a todo-*trans*-retinol, vitamina A1 **(d)** En la ruta de la visión el todo-*trans*-retinol obtenido en esta reacción, u obtenido directamente a través de la dieta, se puede convertir en el aldehído 11-*cis*-retinal. **(e)** Este producto se combina con la proteína opsina formando la rodopsina (no mostrada), pigmento visual muy utilizado en la naturaleza. En la oscuridad, el retinal de la rodopsina se encuentra en la forma 11-*cis* (c). Cuando se excita una molécula de rodopsina con luz visible, el 11-*cis*-retinal experimenta una serie de reacciones fotoquímicas que lo convierten en todo-*trans*-retinal **(f)** forzando un cambio en la forma de la molécula completa de rodopsina. Esta transformación en los bastones de la retina de los vertebrados envía una señal eléctrica hacia el cerebro que es la base de la transducción visual (véase la Fig. 12-14).

cadena lateral que se une al anillo D del esterol. Ambas tienen los mismos efectos biológicos. La vitamina D_2 se añade habitualmente a la leche y a la mantequilla como suplemento dietético. Al igual que con las hormonas esteroides, el producto del metabolismo de la vitamina D, el 1α,25-dihidroxivitamina D_3, regula la expresión génica al interaccionar con proteínas receptoras nucleares específicas (véase pp. 1156-1157).

La **vitamina A_1 (todo-*trans*-retinol)** y sus metabolitos oxidados ácido retinoico y retinal actúan en los procesos de desarrollo, crecimiento celular y diferenciación y en la visión **(Fig. 10-20)**. La vitamina A1 o β-caroteno de la dieta puede convertirse enzimáticamente en ácido retinoico todo-*trans*, una hormona retinoide que actúa a través de una familia de proteínas receptores nucleares (RAR, RXR, PPAR) que regulan la expresión génica central del desarrollo embrionario, la diferenciación de células madre y la proliferación celular. El ácido retinoico todo-*trans* se utiliza para tratar ciertos tipos de leucemia siendo el principio activo del fármaco tretinoína (Retin-A), utilizado para tratar el acné severo y la piel arrugada. En el ojo de los vertebrados, el retinal unido a la proteína opsina forma el pigmento fotorreceptor rodopsina. La conversión fotoquímica del 11-*cis* retinal en retinal todo-*trans* es el acontecimiento fundamental de la visión (véase la Fig. 12-14).

A diferencia de la mayoría de vitaminas, la vitamina A puede almacenarse durante cierto tiempo en el cuerpo (principalmente en forma de éster del ácido palmítico, en el hígado). La vitamina A se aisló por primera vez a partir de aceites de hígado de pescados; los huevos, la leche entera y la mantequilla también son buenas fuentes presentes en la dieta. Otra fuente es el β-caroteno (Fig. 10-20), el pigmento que proporciona el color característico de las zanahorias, boniatos y otros vegetales amarillos. El caroteno es uno de los muchos (>700) **carotenoides,** productos naturales con un extenso sistema característico de dobles enlaces conjugados, que permite su fuerte absorción de la luz visible (450-470 nm).

La deficiencia de vitamina A en las mujeres embarazadas puede producir malformaciones congénitas y retraso mental en el niño. En los adultos la vitamina A es también esencial para la visión, la inmunidad y la reproducción. El déficit de vitamina A produce diversos síntomas, entre ellos la sequedad de la piel, de los ojos y de las membranas mucosas, así como ceguera noctur-

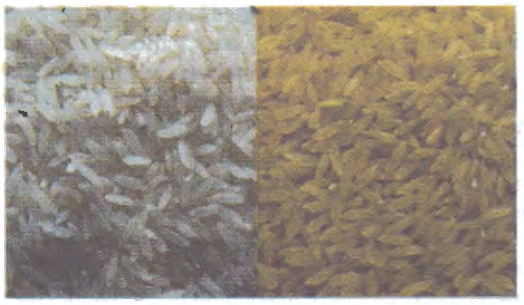


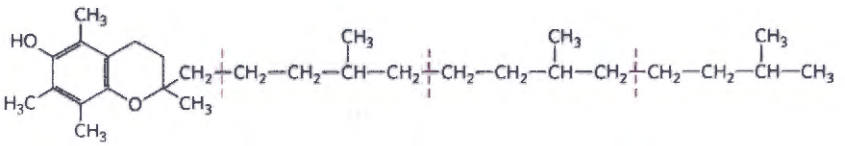
FIGURA 10-21 Arroz enriquecido en caroteno. Unos 200 millones de mujeres y niños en todo el mundo sufren carencia de vitamina A causa de 500.000 casos de ceguera irreversible y hasta 2 millones de muertes anuales, especialmente cuando el arroz es el alimento básico. Un proyecto humanitario internacional -Golden Rice Project- ha hecho avanzar mucho para solucionar esta crisis sanitaria. Los granos de arroz normales (izquierda) no producen β-caroteno, precursor metabólico de la vitamina A. Mediante ingeniería genética se han obtenido plantas de arroz que producen β-caroteno en el grano, el cual adquiere el color amarillo del caroteno (derecha). Un suplemento de Golden Rice en la dieta proporciona el β-caroteno suficiente para evitar la carencia de vitamina A y sus trágicas consecuencias para la salud. [Fuente: Golden Rice Humanitarian Board (www.goldenrice.org).]

na que es un síntoma temprano utilizado normalmente en el diagnóstico de la carencia de vitamina A. Se calcula que, en el tercer mundo, la carencia de vitamina A produce un millón o más de casos de ceguera o muerte cada año. Una estrategia efectiva para proporcionar vitamina A es la ingeniería metabólica de variedades de arroz para que produzcan grandes cantidades de β-caroteno. El arroz contiene toda la maquinaria enzimática para producir β-caroteno en sus hojas, pero estos enzimas son menos activos en el grano. La introducción de dos genes en el arroz ha dado como resultado el "arroz dorado" con granos muy enriquecidos en β-caroteno **(Fig. 10-21)**.

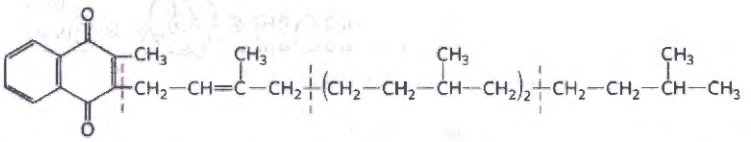
Las vitaminas E y K y las quinonas lipídicas son cofactores de oxidación-reducción

La **vitamina E** es el nombre colectivo de un grupo de lípidos estrechamente relacionados

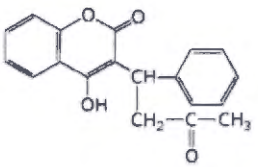
(a) Vitamina E: un antioxidante



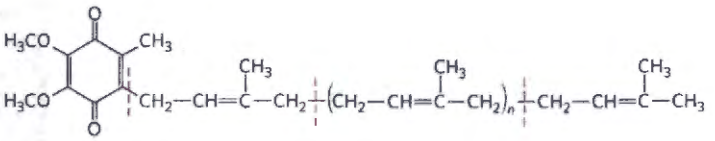
(b) Vitamina K_1: un cofactor de la coagulación sanguínea (filoquinona)



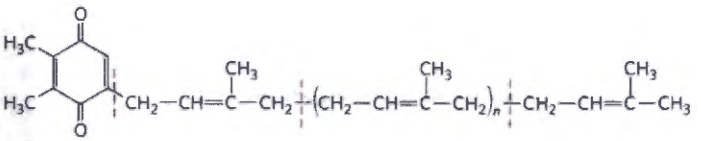
(c) Warfarina: un anticoagulante sanguíneo



(d) Ubiquinona: un transportador de electrones mitocondrial (coenzima Q) (n = 4 - 8)



(e) Plastoquinona: un transportador de electrones en los cloroplastos (n = 4 - 8)



(f) Dolicol: un transportador glucídico (n = 9 - 22)

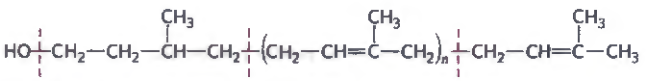


FIGURA 10-22 Otros compuestos isoprenoides, o derivados, biológicamente activos. Las unidades procedentes del isopreno se hallan marcadas por líneas de trazos rojas. En la mayoría de los tejidos de los mamíferos, la ubiquinona (también llamada coenzima Q) tiene diez unidades de isopreno. Los dolicoles de animales tienen entre 17 y 21 unidades de isopreno (de 85 a 105 átomos de carbono), los dolicoles de bacterias tienen 11 y los de plantas y hongos tienen entre 14 y 24.



Henrik Dam, 1895-1976
[Fuente: Science Source.]



Edward A. Doisy, 1893-1986
[Fuente: National Library of Medicine/ Science Photo Library/Science Source.]

denominados **tocoferoles** que contienen un anillo aromático sustituido y una cadena lateral isoprenoide larga **(Fig. 10-22a)**. Dado que son hidrofóbicos, los tocoferoles se asocian con las membranas celulares, depósitos lipídicos y lipoproteínas de la sangre. Los tocoferoles son antioxidantes biológicos. El anillo aromático reacciona con las formas más reactivas de radicales del oxígeno y otros radicales libres destruyéndolas y protegiendo, de este modo, de la oxidación los ácidos grasos insaturados y previniendo así las lesiones oxidativas de los lípidos de las membranas, lo cual puede causar fragilidad celular. Los tocoferoles se encuentran en los huevos y aceites vegetales siendo especialmente abundantes en el germen de trigo. En animales de laboratorio sometidos a dietas carentes de vitamina E aparece piel escamosa, debilidad muscular, pérdida de peso y esterilidad. La deficiencia de vitamina E en seres humanos es muy rara; el principal síntoma es la fragilidad de los eritrocitos.

El anillo aromático de la **vitamina K** (Fig. 10-22b) experimenta un ciclo de oxidación y reducción durante la formación de la protrombina activa, una proteína del plasma sanguíneo esencial para la formación del coágulo sanguíneo. La protrombina es un enzima proteolítico que rompe enlaces peptídicos de la proteína sanguínea fibrinógeno, convirtiéndola en fibrina, la proteína fibrosa insoluble que mantiene unidos los coágulos de sangre (véase la Fig. 6-40). Henrik Dam y Edward A. Doisy descubrieron de forma independiente que la deficiencia de vitamina K da lugar a una coagulación de la sangre más lenta que puede ser fatal. La deficiencia de vitamina K es muy rara en humanos, aparte de un pequeño porcentaje de lactantes que padecen enfermedades hemorrágicas del recién nacido, un trastorno potencialmente fatal. En Estados Unidos, los recién nacidos reciben rutinariamente una inyección de 1 mg de vitamina K. La vitamina K_1 (filoquinona) se encuentra en las hojas de las plantas verdes mientras que una forma relacionada, la vitamina K_2 (menaquinona) es sintetizada por las bacterias que residen en el intestino de los vertebrados.

La warfarina (Fig. 10-22c) es un compuesto sintético que inhibe la formación de protrombina activa. Es muy venenoso para las ratas a las que les produce la muerte por hemorragia interna. Curiosamente, este potente rodenticida es también un valioso medicamento anticoagulante para el tratamiento de los pacientes con riesgo de coagulación excesiva de la sangre, tales como los pacientes operados y los que sufren trombosis coronaria. ■

La ubiquinona (también llamada coenzima Q) y la plastoquinona (Fig. 10-22d, e), son isoprenoides que funcionan como transportadores lipofílicos de electrones en las reacciones de oxidación-reducción que impulsan la síntesis de ATP en la mitocondria y en los cloroplastos, respectivamente. Tanto la ubiquinona como la plastoquinona pueden aceptar bien uno bien dos electrones al tiempo que uno o dos protones (véase la Fig. 19-3).

Los dolicoles activan precursores glucídicos para la biosíntesis

Durante la formación de los glúcidos complejos de las paredes celulares bacterianas así como en la adición de unidades polisacáridas a ciertas proteínas (glucoproteínas) y lípidos (glucolípidos) en eucariotas, las unidades glucídicas que se han de adicionar están activadas quí-

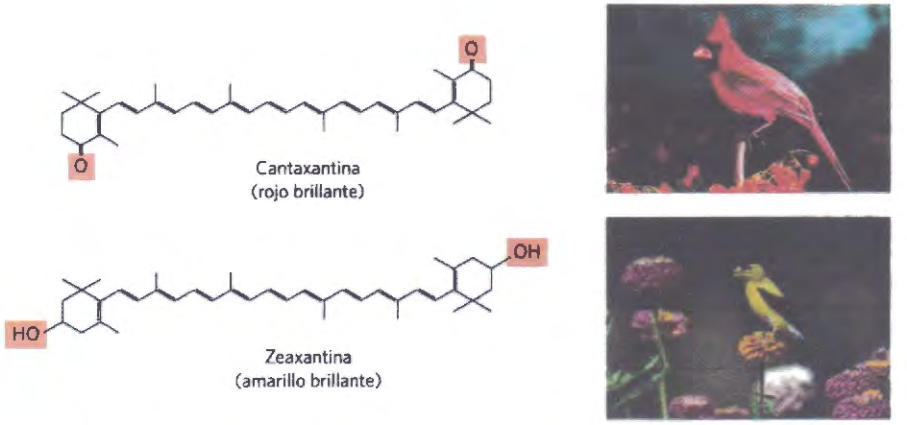
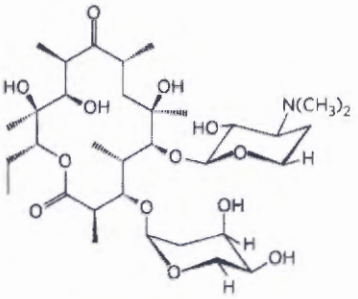
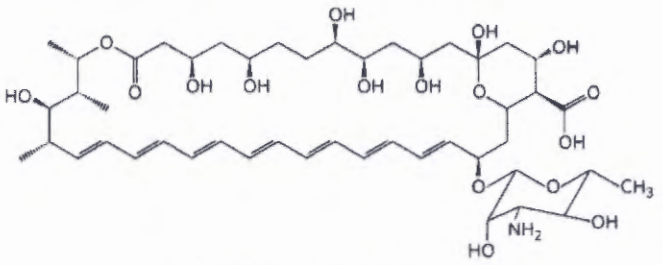


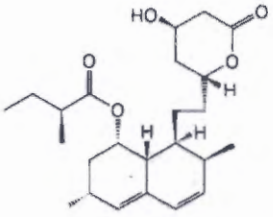
FIGURA 10-23 Los lípidos como pigmentos en plantas y en las plumas de las aves. Los compuestos que contienen extensos sistemas conjugados absorben luz de la región visible del espectro. Diferencias sutiles en la química de estos compuestos producen pigmentos de colores sorprendentemente diferentes. Las aves adquieren los pigmentos que colorean sus plumas de rojo o amarillo al ingerir materiales vegetales que contienen pigmentos carotenoides tales como la cantaxantina y la zeaxantina. Las diferencias de pigmentación entre aves machos y hembras son el resultado de diferencias en la captación intestinal y en la modificación de los carotenoides. [Fuentes: Cardenal rojo: Dr. Dan Sudia/ Science Source. Jilguero: Richard Day/VIREO.]



Eritromicina (antibiótico)



Anfotericina B (antifúngico)



Lovastatina (estatina)

FIGURA 10-24 **Tres policétidos naturales utilizados en medicina humana.**

micamente mediante unión a alcoholes isoprenoides denominados **dolicoles** (Fig. 10-22f). Estos compuestos tienen interacciones hidrofóbicas fuertes con los lípidos de membrana, anclando los glúcidos unidos a la membrana en donde participan en reacciones de transferencia de glúcidos.

Muchos pigmentos naturales son dienos conjugados lipídicos

Los dienos conjugados tienen cadenas carbonadas en las que se alternan enlaces dobles y sencillos. Debido a que este ordenamiento estructural permite la deslocalización de electrones, los compuestos se pueden excitar mediante radiación electromagnética de baja energía (luz visible), confiriéndoles coloración visible tanto a los humanos como a otros animales. El caroteno (Fig. 10-20) es amarillo anaranjado; compuestos parecidos son responsables de los llamativos colores rojo, naranja o amarillo de las plumas de las aves **(Fig. 10-23)**. Lo mismo que los esteroles, esteroides, dolicoles, vitaminas A, E, D y K, ubiquinona y plastoquinona, estos pigmentos se sintetizan a partir de derivados del isopreno de cinco carbonos; la ruta biosintética se describe detalladamente en el Capítulo 21.

Los policétidos son productos naturales con actividades biológicas potentes

Los **policétidos** forman un grupo variado de lípidos con rutas biosintéticas similares a las de los ácidos grasos (condensación de Claisen). Son **metabolitos secundarios**, compuestos que no son de importancvia esenciasl en el metabolismo de un organismo pero que tienen alguna función subsidiaria que comunica a los organismos que los producen una ventaja en un nicho ecológico determinado. Muchos policétidos tienen utilidad en medicina como antibióticos (eritromicina), antifúngicos (anfotericina B) o inhibidores de la síntesis del colesterol (lovastatina) **(Fig. 10-24)**.

RESUMEN 10.3 Los lípidos como señales, cofactores y pigmentos

- Algunos tipos de lípidos, aunque presentes en cantidades relativamente pequeñas, tienen papeles esenciales como cofactores o señales.
- El fosfatidilinositol bisfosfato se hidroliza dando dos mensajeros intracelulares, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trisfosfato. El fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato constituye un punto de nucleación para los complejos proteicos supramoleculares que actúan en la señalización biológica.
- Las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas, todos ellos icosanoides procedentes del araquidonato, son hormonas muy potentes.
- Las hormonas esteroides, tales como las hormonas sexuales, provienen de los esteroles y actúan como señales biológicas potentes, alternado la expresión génica en las células diana.
- Las vitaminas A, D, E y K son compuestos liposolubles formados por unidades de isopreno. Todas tienen papeles esenciales en el metabolismo o la fisiología de los animales. La vitamina D es el precursor de una hormona que regula el metabolismo del calcio. La vitamina A proporciona el pigmento visual del ojo de los vertebrados y actúa como regulador de la expresión génica durante el crecimiento de las células epiteliales. La vitamina E actúa en la protección de los lípidos de membrana frente a la lesión oxidativa y la vitamina K es esencial en el proceso de coagulación de la sangre.
- Las ubiquinonas y plastoquinonas también son derivados isoprenoides que actúan como transportadores de electrones en las mitocondrias y cloroplastos, respectivamente.
- Los dolicoles activan y anclan sobre membranas celulares glúcidos utilizados en la síntesis de glúcidos complejos, glucolípidos y glucoproteínas.
- Los pigmentos de las flores y frutos y las que dan sus colores llamativos a las plumas de las aves son dienos conjugados lipídicos.
- Los policétidos son productos naturales muy usados en medicina.

10.4 Trabajando con lípidos

Debido a que los lípidos son insolubles en agua, su extracción y el posterior fraccionamiento requieren la utilización de disolventes orgánicos y algunas técnicas poco usadas en la purificación de moléculas hidrosolubles tales como las proteínas y los glúcidos. En general, las mezclas complejas de lípidos se separan por las diferencias en la polaridad o solubilidad en disolventes apolares. Los lípidos que contienen ácidos grasos en enlace éster o amida se pueden hidrolizar tratándolos con un ácido o un álcali o con enzimas hidrolíticos específicos (fosfolipasas, glucosidasas) para analizar sus componentes. Algunos métodos comúnmente utilizados para el análisis de lípidos se muestran en la **Figura 10-25** y se estudian a continuación.

La extracción de lípidos requiere la utilización de disolventes orgánicos

Los lípidos neutros (triacilgliceroles, ceras, pigmentos, etc.) se extraen fácilmente de los tejidos con éter etílico, cloroformo o benceno, disolventes en los que no se produce la agregación de lípidos promovida por el efecto hidrofóbico. Los lípidos de membrana se extraen mejor con disolventes orgánicos más polares, tales como etanol o metanol que reducen las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de lípidos pero que también debilitan los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas que unen los lípidos de membrana a las proteínas de membrana. Una solución extractiva muy utilizada es una mezcla de cloroformo, metanol y agua, inicialmente en proporciones que sean miscibles produciendo una sola fase (1:2:0,8). Después de homogenar el tejido en este disolvente para extraer todos los lípidos, se añade más agua al extracto resultante, que se separa en dos fases, metanol/agua (fase superior) y cloroformo (fase inferior). Los lípidos permanecen en el cloroformo, y las moléculas más polares tales como proteínas y glúcidos se sitúan en la fase polar de metanol/agua (Fig. 10-25a).

La cromatografía de adsorción separa los lípidos de polaridad diferente

Las mezclas complejas de lípidos tisulares se pueden fraccionar mediante procedimientos cromatográficos basados en la diferente polaridad de cada clase de lípido(Fig. 10-25b). En la cromatografía de adsorción, se empaqueta un material polar insoluble, tal como el gel de sílice (una forma de ácido silícico, $Si(OH)_4$) en una columna de vidrio aplicándose la mezcla de lípidos (en solución de cloroformo) en la parte superior de la columna. (En cromatografía líquida de alta resolución, la columna tiene un diámetro menor y los disolventes se fuerzan a pasar a través de la columna a altas presiones). Los lípidos polares se fijan fuertemente al ácido silícico polar mientras que los lípidos neutros pasan directamente a través de la columna y emergen en el primer lavado con cloroformo. A continuación se eluyen los lípidos polares, en orden de polaridad creciente, lavando la columna progresivamente con disolventes de mayor polaridad. Los lípidos polares pero sin carga (cerebrósidos, por ejemplo) se eluyen con acetona y los lípidos muy polares o cargados (tales como los glicerofosfolípidos), se eluyen con metanol.

La cromatografía en capa fina sobre ácido silícico utiliza el mismo principio (Fig. 10-25b). Se distribuye una fina capa de gel de sílice sobre una placa de vidrio a la que se adhiere. Se aplica una pequeña muestra de lípidos disueltos en cloroformo cerca del borde de la placa la cual se sumerge en un recipiente poco profundo con un disolvente orgánico, o una mezcla de disolven-

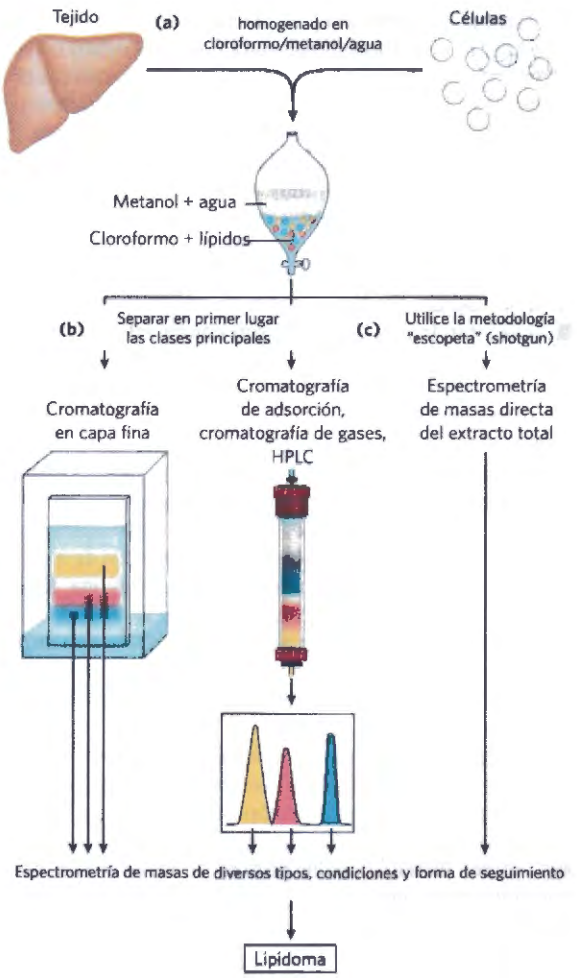


FIGURA 10-25 Procedimientos comunes utilizados en la extracción, separación e identificación de lípidos celulares. **(a)** Se homogeniza el tejido en una mezcla cloroformo/metanol/agua, la cual al añadir más agua y eliminar el sedimento no extraíble por centrifugación proporciona dos fases. **(b)** Las clases principales de lípidos extraídas en la fase cloroformo pueden separarse en primer lugar mediante cromatografía en capa fina (TLC) en la que los lípidos son arrastrados sobre una placa recubierta con gel de sílice por un frente de disolvente ascendente. Los lípidos menos polares se desplazan más rápidamente que los lípidos más polares o los que están cargados.También se puede utilizar la cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice a través de la que se hacen pasar disolventes de polaridad creciente. Por ejemplo, la cromatografía en columna con disolventes adecuados puede utilizarse para separar especies lipídicas muy semejantes tales como fosfatidilserina, fosfatidilglicerol. Una vez separados se puede determinar el complemento de ácidos grasos de cada lípido mediante espectrometría de masas. **(c)** De modo alternativo mediante la técnica del "shotgun" (escopeta), se puede someter un extracto de lípidos sin fraccionar directamente a espectrometría de masas de alta resolución de diferentes tipos y bajo condiciones diferentes para determinar la composición total de lípidos, es decir, el lipidoma.

tes, contenidos dentro de una cámara cerrada saturada con vapor del disolvente. A medida que el disolvente asciende por la placa por acción de la capilaridad arrastra consigo los lípidos. Los lípidos menos polares son los que se desplazan más rápidamente ya que tienen menos tendencia a unirse al ácido silícico. Después de su separación se pueden detectar los lípidos pulverizando sobre la placa con un colorante (rodamina) que presenta fluorescencia cuando se asocia con lípidos o bien exponiendo la placa a los vapores de yodo. El yodo reacciona reversiblemente con los dobles enlaces de los ácidos grasos confiriendo a los lípidos que los contengan un color amarillo o marrón. Existe una gran variedad de reactivos que se pulverizan y que son también útiles en la detección de lípidos específicos. Para el análisis posterior, se pueden rascar de la placa las regiones que contienen los lípidos separados recuperándolos por extracción con un disolvente orgánico.

La cromatografía de gases separa las mezclas de derivados lipídicos volátiles

La cromatografía de gases (GC) separa los componentes volátiles de una mezcla según sus tendencias relativas a disolverse en el material inerte empaquetado en la columna cromatográfica o a volatilizarse desplazándose a través de la columna arrastrados por una corriente de un gas inerte tal como el helio. Algunos lípidos son de naturaleza volátil pero la mayoría han de modificarse previamente para aumentar sn volatilidad (esto es, disminuir su punto de ebullición). Para el análisis de los ácidos grasos presentes en una muestra de fosfolípidos, se someten primeramente a transesterificación: se calientan en una mezcla metanol/HCl o metanol/NaOH, que convierte los ácidos grasos que esterificaban al glicerol en sus ésteres metílicos. Se aplican a continuación estos ésteres metílicos de los acilos grasos en una columna de cromatografía gas-líquido y se calienta ésta para volatilizar los compuestos. Aquellos ésteres de acilo graso más solubles en el material de la columna se reparten (disuelven) en el mismo; los menos solubles son arrastrados por la corriente de gas inerte y emergen en primer lugar de la columna. El orden de elución depende de la naturaleza del adsorbente sólido de la columna y del punto de ebullición de los componentes de la mezcla lipídica. Con la utilización de estas técnicas se pueden separar completamente mezclas de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y diversos grados de insaturación.

La hidrólisis específica ayuda a determinar la estructura lipídica

Ciertas clases de lípidos son susceptibles de degradación en condiciones específicas. Por ejemplo, todos los ácidos grasos unidos por enlace éster en los triacilgliceroles, fosfolípidos y ésteres de esteroles se liberan mediante tratamiento ácido o alcalino suave mientras que un tratamiento algo más fuerte libera los ácidos grasos unidos por enlace amida de los esfingolípidos. Los enzimas que hidrolizan específicamente ciertos lípidos también son útiles en la determinación de la estruc-

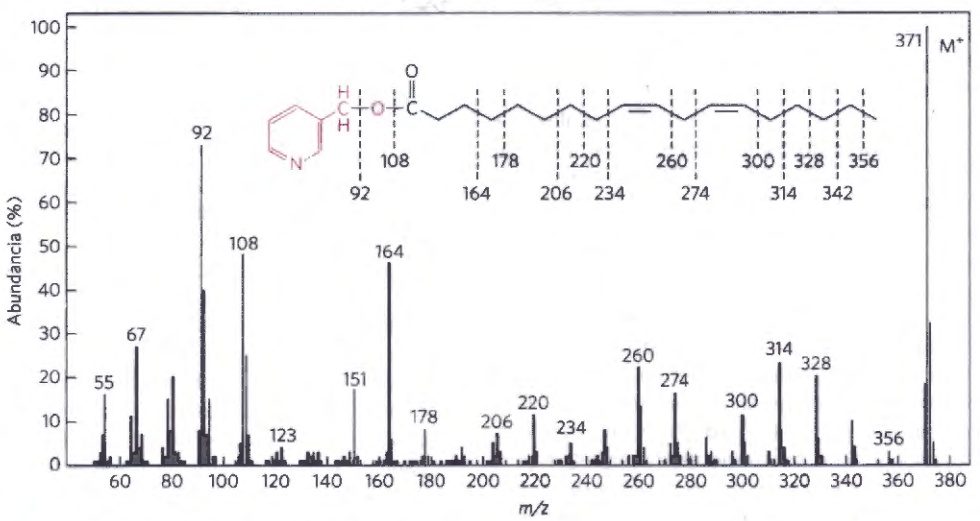


FIGURA 10-26 Determinación de la estructura de un ácido graso por espectrometría de masas. El ácido graso se convierte en primer lugar en un derivado que minimiza la migración de los dobles enlaces cuando se fragmenta la molécula mediante bombardeo por electrones. El derivado aquí mostrado es un éster picolinilo del ácido linoleico, 18:2($\Delta^{9,12}$) (*Mr* 371), en el que el alcohol es el picolinol (rojo). Cuando se bombardea con una corriente de electrones, esta molécula se volatiliza y se convierte en el ión inicial (M^+; *Mr* 371), en el que el átomo de N lleva una carga positiva, y en una serie de fragmentos menores producidos por rotura de enlaces C—C en el ácido graso. El espectrómetro de masas separa estos fragmentos cargados según su razón masa/carga (m/z). (Para revisión de los principios de la espectrometría de masas véanse las pp. 100-102). Los iones prominentes a m/z = 92, 108, 151 y 164 contienen el anillo de piridina del picolinol y varios fragmentos del grupo carboxilo, lo que demuestra que el compuesto es, desde luego, un éster picolinilo. El ión molecular (m/z = 371) confirma la presencia de un ácido graso C_{18} con dos dobles enlaces. La serie uniforme de iones separados por 14 unidades de masa atómica (u) representa la pérdida de sucesivos grupos metilo y metileno desde el extremo metilo de la cadena acílica (empezando en el C-18; el extremo derecho de la molécula tal como se muestra aquí), hasta que se llega al ión de m/z = 300. A este le sigue un hueco de 26 u para los carbonos del doble enlace terminal con m/z = 274; otro hueco de 14 u para el grupo metileno C-11 a m/z = 260 y así sucesivamente. De esta manera se determina la estructura completa, aunque estos datos por sí solos no revelan la configuración (cis o trans) de los dobles enlaces. [Fuente: W. W. Christie, *Lipid Technol.* 8:64, 1996.]

TABLA 10-2 Las ocho categorías principales de lípidos biológicos

Categoría	Código de la categoría	Ejemplos
Ácidos grasos	FA	Oleato, estearil.CoA, palmitilcarnitina
Glicerolípidos	GL	Di- y triacilgliceroles
Glicerofosfolípidos	GP	Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina
Esfingolípidos	SP	Esfingomielina, gangliósido GM2
Lípidos esteroles	ST	Colesterol, progesterona, ácidos biliares
Lípidos prenoles	PR	Farnesol, geraniol, retinol, ubiquinona
Sacarolípidos	SL	Lipopolisacárido
Policétidos	PK	Tetraciclina, eritromicina, aflatoxina B_1

tura lipídica. Las fosfolipasas A, C y D (Fig. 10-15) hidrolizan enlaces específicos en los fosfolípidos dando productos de solubilidad y comportamiento cromatográfico característicos. La fosfolipasa C, por ejemplo, libera un fosforil alcohol hidrosoluble (tal como la fosfocolina en la fosfatidilcolina) y un diacilglicerol soluble en cloroformo, cada uno de los cuales se puede caracterizar separadamente para determinar la estructura del fosfolípido intacto. La combinación de hidrólisis específica con caracterización de los productos por cromatografía en capa fina, cromatografía gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución permite, a menudo, la determinación de la estructura de un lípido.

La espectrometría de masas revela la estructura lipídica completa

Para establecer sin ambigüedades la longitud de una cadena hidrocarbonada o la posición de los dobles enlaces, es de gran valor el análisis por espectrometría de masas de los lípidos o de sus derivados volátiles. Las propiedades químicas de lípidos similares (por ejemplo, dos ácidos grasos de longitud similar insaturados en posiciones diferentes o dos isoprenoides con un número diferente de unidades isopreno) son muy parecidas pero, a menudo, la posición de elución utilizando varios métodos cromatográficos no los distingue entre sí. Sin embargo, cuando se acopla un espectrómetro de masas a la salida de una columna cromatográfica, los componentes de la mezcla lipídica pueden ser separados e identificados simultáneamente por su patrón de fragmentación característico (**Fig. 10-26**). Con el aumento de la resolución de la espectrometría de masas, es posible identificar lípidos concretos en mezclas muy complejas sin tener que fraccionar previamente los lípidos de un extracto crudo. Este método de "escopeta" (Fig. 10-25c) evita pérdidas durante la separación preliminar de las subclases de lípidos y además es más rápido.

La lipidómica pretende catalogar todos los lípidos y sus funciones

A medida que los bioquímicos especializados en lípidos se han dado cuenta de los miles de lípidos presentes en la naturaleza han procedido a crear una base de datos análoga al Protein Data Bank. El LIPID MAPS Lipidomics Gateway (www.lipidmaps.org) tiene su propio sistema de clasificación que sitúa cada especie lipídica en una de ocho categorías, cada una de las cuales se designa mediante dos letras (Tabla 10-2). Dentro de cada categoría se establecen distinciones más finas mediante clases y subclases numeradas. Por ejemplo, todas las glicerofosfocolinas pertenecen a GP01. El subgrupo de las glicerofosfocolinas con dos ácidos grasos en enlace éster se designa GP0101; el subgrupo con un ácido graso unido por enlace éter en la posición 1 y un enlace éster en la posición 2, constituye GP0102. Los ácidos grasos específicos se designan con números que proporcionan a cada lípido su propio identificador único, de modo que cada lípido concreto, incluidos tipos de lípidos aún no descubiertos, se puede describir sin ambigüedad en términos de un identificador de 12 caracteres, el LM_ID. Un factor utilizado en esta clasificación es la naturaleza del precursor biosintético. Por ejemplo, los lípidos prenólicos (tales como los dolicoles y las vitaminas E y K, por ejemplo) se forman a partir de precursores isoprenilo.

Las ocho categorías químicas de la Tabla 10-2 no coinciden perfectamente con las divisiones según la categorización menos formal de acuerdo con la función biológica que hemos utilizado en este capítulo. Por ejemplo, los lípidos estructurales de membrana incluyen tanto glicerofosfolípidos como esfingolípidos que se consideran categorías separadas en la Tabla 10-2. Cada método de categorización tiene sus ventajas.

La aplicación de las técnicas espectrometría de masas de alta resolución puede proporcionar catálogos cuantitativos de todos los lípidos presentes en un tipo celular específico –el **lipidoma**- en condiciones determinadas y de las formas en las que el lipidoma se modifica con la diferenciación, enfermedades tales como el cáncer o en el tratamiento con fármacos. Una célula animal contiene alrededor de un millar de especies lipídicas diferentes, cada una de las cuales tiene, probablemente, una función específica. Se conocen estas funciones para un número creciente de lípidos, pero el lipidoma, en gran parte sin explorar, ofrece una fuente de nuevos problemas que ha de resolver la próxima generación de bioquímicos y biólogos celulares.

RESUMEN 10.4 Trabajando con lípidos

■ En la determinación de la composición lipídica, los lípidos se extraen primero de los tejidos con disolventes orgánicos y se separan mediante cromatografía en capa fina, gas-líquido o cromatografía líquida de alta resolución.

- Se pueden utilizar fosfolipasas específicas para uno de los enlaces de un fosfolípido para generar compuestos más sencillos para su posterior análisis.
- Los lípidos individuales se identifican por su comportamiento cromatográfico, su susceptibilidad a la hidrólisis por enzimas específicos o por espectrometría de masas.
- La espectrometría de masas de alta resolución permite el análisis de mezclas crudas de lípidos sin necesidad de fraccionamiento previo: la técnica de la "escopeta".
- La lipidómica combina técnicas analíticas muy potentes para determinar la composición total de lípidos de una célula o tejido (el lipidoma) y para reunir bases de datos comentadas que permiten la comparación entre lípidos de diferentes tipos celulares y bajo condiciones diferentes.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

ácido graso 359
ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) 361
triacilgliceroles 362
lipasas 362
fosfolípido 365
glucolípido 365
glicerofosfolípido 365
lípido con enlace éter 366
plasmalógeno 367
galactolípido 367
esfingolípido 368
ceramida 368
esfingomielina 368
glucoesfingolípido 368
cerebrósido 3368
globósido 368
ganglósido 368
esterol 370
colesterol 370
prostaglandina (PG) 373
tromboxano (TX) 374
leucotrieno (LT) 374
lipoxina (LX) 374
vitamina 375
vitamina D_3 375
colecalciferol 375
vitamina A_1 (todo-*trans*-retinol) 376
vitamina E 377
tocoferol 378
vitamina K 378
dolicol 379
policétido 379
lipidoma 382

Problemas

1. Definición operacional de lípidos ¿En qué aspecto es diferente la definición de "lípido" de los tipos de definiciones utilizados con otras biomoléculas tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas?

2. Estructura de un ácido graso omega-6 Dibuje la estructura del ácido omega-6 correspondiente a 16:1.

3. Punto de fusión de los lípidos Los puntos de fusión de una serie de ácidos grasos de 18 carbonos son: ácido esteárico 69,6 °C; ácido oleico; 13,4 °C; ácido linoleico; -5 °C y ácido linolénico –11 °C.

(a) ¿Qué aspecto estructural de estos ácidos grasos de 18 carbonos puede correlacionarse con el punto de fusión?

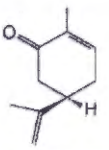
(b) Dibuje todos los triacilgliceroles posibles que se pueden construir a partir de glicerol, ácido palmítico, y ácido oleico. Ordénelos según el incremento en su punto de fusión.

(c) Los ácidos grasos de cadena ramificada se encuentran en lípidos de membrana de algunas bacterias. ¿Su presencia aumenta o disminuye la fluidez de las membranas (es decir, tienen éstas puntos de fusión menores o mayores)? ¿Por qué?

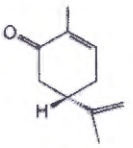
4. Hidrogenación catalítica de aceites vegetales La hidrogenación catalítica, utilizada en la industria alimentaria, convierte dobles enlaces en los ácidos grasos de los triacilgliceroles del aceite en $-CH_2-CH_2-$. ¿De qué modo afecta esto a las propiedades físicas de los aceites?

5. Impermeabilidad de las ceras ¿Qué propiedad de las cutículas céreas que cubren las hojas de las plantas hace que las cutículas sean impermeables al agua?

6. Nomenclatura de estereoisómeros lipídicos Los dos compuestos representados a continuación son estereoisómeros de la carvona con propiedades muy diferentes; el de la izquierda huele a hierbabuena mientras que el de la derecha huele como la alcaravea. Nombre los compuestos utilizando el sistema RS.

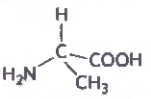


Hierbabuena

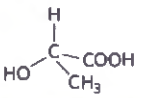


Alcaravea

7. Designaciones RS de la alanina y el lactato Dibuje (utilizando la notación de cuñas para los enlaces) y marque los isómeros (*R*) y (*S*) del ácido 2-aminopropanoico (alanina) y del ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico)



Ácido 2-aminopropanoico (alanina)



Ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico)

8. Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de los lípidos de membrana Un rasgo estructural común de los lípidos de membrana es su naturaleza anfipática. Por ejemplo, en la fosfatidilcolina, las dos cadenas de ácido graso son hidrofóbicas y el grupo de cabeza fosfocolina es hidrofílico. De cada uno de los siguientes lípidos de membrana indique los componentes que constituyen las unidades hidrofóbicas y las hidrofílicas: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrósido; (d) ganglósido; (e) colesterol.

9. Deducción de la estructura lipídica a partir de la composición El análisis de la composición de cierto lípido muestra que tiene exactamente un mol de ácido graso por molécula de fosfato inorgánico. ¿Podría tratarse de un glicerofosfolípido? ¿De un ganglósido? ¿De una esfingomielina?

10. Deducción de la estructura lipídica a partir de la razón molar de los componentes La hidrólisis completa de un glicerofosfolípido da glicerol, dos ácidos grasos (16:1(Δ^9) y 16:0), ácido fosfórico y serina en proporción molar 1:1:1:1. Nombre este lípido y dibuje su estructura.

11. Lípidos en la determinación del grupo sanguíneo Hemos puesto de manifiesto en la Figura 10-14 que la estructura de los glucoesfingolípidos determina los grupos sanguíneos A, B y O en la especie humana. También es cierto que las glucoproteínas determinan los grupos sanguíneos. ¿Cómo pueden ser ciertas ambas afirmaciones?



12. Acción de las fosfolipasas Los venenos de la serpiente de cascabel del este de los Estados Unidos y de la cobra de la India contienen fosfolipasa A_2 que cataliza la hidrólisis de ácidos grasos en la posición C-2 de glicerofosfolípidos. El producto de esta reacción de rotura del fosfolípido es

la lisolecitina (la lecitina es fosfatidilcolina). A elevadas concentraciones, éste y otros lisofosfolípidos actúan como detergentes, disolviendo la membrana de los eritrocitos y lisando las células. La hemólisis generalizada puede ser amenazadora para la vida.

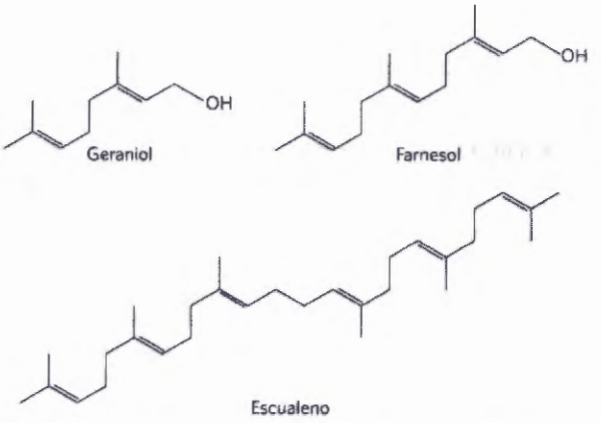
(a) Todos los detergentes son anfipáticos. ¿Cuáles son las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la lisolecitina?

(b) El dolor y la inflamación causados por la mordedura de serpiente pueden tratarse con ciertos esteroides. ¿Cuál es la base de este tratamiento?

(c) Si bien niveles elevados de fosfolipasa A_2 en el veneno pueden ser mortales, este enzima es necesario para varios procesos metabólicos habituales. ¿Cuáles son estos procesos?

13. Mensajeros intracelulares a partir de fosfatidilinositoles Cuando la hormona vasopresina estimula la rotura del PIP_2 por la fosfolipasa C se forman dos productos. ¿Cuáles son? Compare sus propiedades y solubilidades en agua y prediga si es esperable que alguno de ellos difunda rápidamente en el citosol.

14. Unidades de isopreno en los isoprenoides Geraniol, farnesol y escualeno se denominan isoprenoides porque se sintetizan a partir de unidades de isopreno de cinco carbonos. En cada compuesto sitúe dentro de un círculo las unidades de cinco carbonos que representan unidades de isopreno (véase la Tabla 10-22).



15. Hidrólisis de lípidos Nombre los productos obtenidos en la hidrólisis suave con NaOH diluido de: (a) 1-estearil-2,3-dipalmitilglicerol; (b) 1-palmitil-2-oleilfosfatidilcolina.

16. Efecto de la polaridad sobre la solubilidad Clasifique en orden de solubilidad creciente en agua: un triacilglicerol, un diacilglicerol y un monoacilglicerol que contengan solamente ácido palmítico.

17. Separación cromatográfica de lípidos Se aplica una mezcla de lípidos a una columna de gel de sílice y, a continuación, la columna se lava con disolventes cada vez más polares. La mezcla consiste en: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesteril palmitato (un éster de esterol), esfingomielina, palmitato, *n*-tetradecanol, triacilglicerol y colesterol. ¿En qué orden espera que eluyan los lípidos de la columna? Explique su razonamiento.

18. Identificación de lípidos desconocidos Johann Thudichum, que practicó la medicina en Londres hace unos 100 años, también se interesó por la química de los lípidos en su tiempo libre. Aisló diversos lípidos del tejido nervioso caracterizando y poniendo nombre a muchos de ellos. Sus viales de lípidos aislados, cuidadosamente sellados y marcados, fueron redescubiertos muchos años después.

(a) ¿Cómo podría confirmar, utilizando técnicas que no estaban disponibles en época de Thudichum, que los viales marcados "esfingomielina" y "cerebrósido" contienen realmente estos compuestos?

(b) ¿Cómo podría distinguir la esfingomielina de la fosfatidilcolina mediante ensayos químicos, físicos o enzimáticos?

19. La ninhidrina para detectar lípidos en placas de cromatografía en capa fina La ninhidrina reacciona específicamente con las aminas primarias formando un producto azul purpúreo. Una cromatografía en capa fina que contiene fosfolípidos de hígado de rata se pulveriza con ninhidrina y se deja que se forme el color. ¿Qué fosfolípidos se pueden detectar de esta manera?

Problema de análisis de datos

20. Determinación de la estructura del lípido anormal en la enfermedad de Tay-Sachs La Figura 1 del Recuadro 10-1 muestra la ruta de degradación de gangliósidos en individuos sanos (normales) y en individuos con ciertas enfermedades genéticas. Algunos de los datos en que se basa la figura fueron presentados por Lars Svennerholm (1962). Observe que el azúcar Neu5Ac, ácido *N*-acetilneuramínico, representado en la figura del Recuadro 10-2 mediante ◆, es un ácido siálico.

Svennerholm indicó que "alrededor del 90% de los monosialogangliósidos aislados de cerebro humano normal" consistía en un compuesto que contenía ceramida, hexosa, *N*-acetilgalactosamina y ácido *N*-acetilneuramínico en proporción molar 1:3:1.1.

(a) ¿Cuál de los gangliósidos (de GM1 a GM3 y globósido) de la Figura 1 del Recuadro10-1, concuerda con esta descripción?. Explique su razonamiento.

(b) Svennerholm indicó que el 90% de los gangliósidos de un paciente con la enfermedad de Tay-Sachs tenía una proporción molar (de los mismos cuatro componentes indicado previamente) de 1:2:1:1. ¿Está ello de acuerdo con la figura del Recuadro 10-1? Explique por qué.

Para determinar la estructura con mayor detalle, Svennerholm trató los gangliósidos con neuraminidasa para eliminar el ácido *N*-acetilneuramínico. Esto condujo a un asialoganglió-sido mucho más fácil de analizar. Lo hidrolizó con ácido, recogió los productos que contenían ceramida y determinó la razón molar de los azúcares de cada producto. Lo hizo tanto con el ganglió-sido normal como con el de Tay Sachs. Los resultados se muestran a continuación.

Ganglió-sido	Ceramida	Glucosa	Galactosa	Galactosamina
Normal				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1
Fragmento 4	1	1	2	1
Tay-Sachs				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1

(c) Basándose en estos datos, ¿qué puede concluir acerca de la estructura del ganglíosido normal? ¿Está de acuerdo con la estructura en el Recuadro 10-1? Explique por qué.
¿Qué puede concluir acerca de la estructura del ganglíosido de Tay-Sachs? ¿Está de acuerdo con la estructura del Recuadro 10-1? Explique por qué.

Svennerholm también describió el trabajo de otros investigadores que "permetilaron" el asialoganglíosido normal. Permetilación es lo mismo que metilación exhaustiva: se adiciona un grupo metilo a cada hidroxilo libre de un azúcar. Encontraron los siguientes azúcares permetilados: 2,3,6-trimetilglucopiranosa; 2,3,4,6-tetrametilgalactopiranosa; 2,4,6-trimetilgalactopiranosa y 4,6-dimetil-2-desoxi-2-aminogalactopiranosa.

(e)¿A qué azúcar del GM1 corresponde cada uno de los azúcares permetilados? Explique por qué.

(f) Basándose en todos los datos hasta aquí presentados ¿qué información falta acerca de la estructura del ganglíosido normal?

Referencia

Svennerholm, L. 1962. The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9:436–441.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 11

Membranas biológicas y transporte

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e..

11.1 Composición y arquitectura de las membranas 388

11.2 Dinámica de membranas 397

11.3 Transporte de solutos a través de membranas 405

Probablemente la primera célula apareció en el momento en que se formó una membrana que encerraba un pequeño volumen de solución acuosa y lo separaba del resto del universo. Las membranas definen los límites externos de las células y regulan el tráfico molecular a través de estos límites **(Fig. 11-1)**; en células eucarióticas también dividen el espacio interno en compartimientos discretos para segregar procesos y componentes. Proteínas incrustadas y asociadas con membranas organizan secuencias complejas de reacciones y son de importancia principal tanto para la conservación de la energía biológica como para la comunicación intercelular. Las actividades biológicas de las membranas son consecuencia de sus notables propiedades físicas. Las membranas son flexibles, auto-reparadoras y selectivamente permeables a los solutos polares. Su flexibilidad les permite los cambios de forma que acompañan el crecimiento celular y el movimiento (tal como el movimiento ameboide). Su capacidad para romperse y volverse a sellar permite que se fusionen dos membranas, tal como sucede en la exocitosis, o que un compartimiento sencillo dentro de una membrana pueda experimentar una fisión dando lugar a la formación de dos compartimientos sellados tal como ocurre en la endocitosis o en la división celular sin que se produzcan grandes pérdidas a través de la superficie celular. Debido a que las membranas son selectivamente permeables retienen ciertos compuestos e iones dentro de las células y de los compartimientos celulares específicos al tiempo que excluyen a otros.

Las membranas no son meras barreras pasivas. Incluyen en su composición un conjunto de proteínas especializadas en promover o catalizar diversos procesos celulares. En la superficie celular, los transportadores mueven solutos orgánicos así como iones inorgánicos a través de la membrana; los receptores captan señales externas y provocan cambios moleculares en la célula y las moléculas de adhesión mantienen células vecinas unidas. Dentro de la célula, existen membranas que organizan procesos celulares tales como la síntesis de lípidos y de ciertas proteínas, y la transducción de energía en mitocondrias y cloroplastos. Las membranas están compuestas simplemente por dos capas de moléculas por lo que son muy delgadas; se las puede considerar básicamente como bidimensionales. Debido a que las colisiones intermoleculares son mucho más probables en este espacio bidimensional que en el espacio tridimensional la eficiencia de ciertos procesos catalizados enzimáticamente es mucho mayor dentro de una membrana bidimensional.

En este capítulo describimos en primer lugar la composición de las membranas celulares y su arquitectura química, es decir la estructura molecular sobre la que se asientan sus funciones biológicas. A continua-

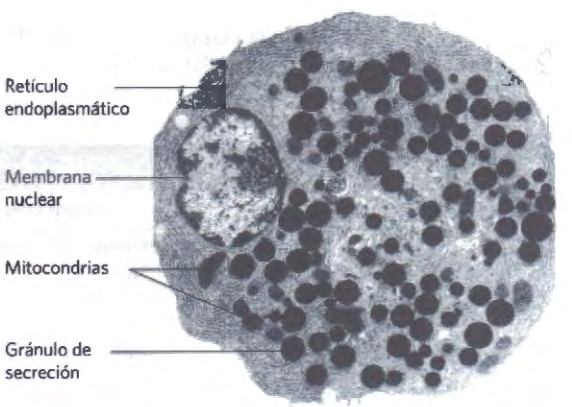


FIGURA 11-1 Membranas biológicas. Esta micrografía electrónica de una fina sección de una célula exocrina de páncreas muestra varios compartimientos formados o rodeados de membranas: retículo endoplasmático, mitocondrias y gránulos secretores. [Fuente: Don W. Fawcett/Science Source.]

ción describiremos las extraordinarias características dinámicas de las membranas en las que lípidos y proteínas se desplazan unos con respecto a las otras. La adhesión celular, la endocitosis y las fusiones de membrana que tienen lugar tras la secreción de un neurotransmisor ilustrarán el papel dinámico de las proteínas de membrana. Pasaremos a continuación al transporte de solutos a través de las membranas con intervención de transportadores y canales iónicos. En capítulos posteriores describiremos el papel de las membranas en la transducción de señales (Capítulos 12 y 23), transducción de energía (Capítulo 19 y 20), síntesis de lípidos (Capítulo 21), y síntesis de proteínas (Capítulo 27).

11.1 Composición y arquitectura de las membranas

Una manera de entender la función de las membranas es estudiar su composición para determinar, por ejemplo, qué componentes están normalmente presentes en todas las membranas y cuáles se encuentran únicamente en membranas con funciones específicas. Antes de describir la estructura y función de la membrana consideraremos los componentes moleculares de las membranas: las proteínas y lípidos polares que constituyen casi la totalidad de la masa de las membranas biológicas; y los glúcidos presentes formando parte de glucoproteínas y glucolípidos.

Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica

Las proporciones relativas de proteína y lípido varían con cada tipo de membrana (Tabla 11-1), lo que refleja la diversidad de papeles biológicos. Por ejemplo, ciertas neuronas tienen una vaina de mielina, una membrana plasmática extensa que se enrolla muchas veces alrededor de la célula y que actúa como aislante eléctrico pasivo. La vaina de mielina consiste principalmente en lípidos (buenos aislantes), mientras que las membranas plasmáticas de bacterias, y las membranas de mitocondrias y cloroplastos en las que tienen lugar muchos procesos metabólicos catalizados enzimáticamente contienen más proteína que lípido (en masa sobre masa total).

Para los estudios de la composición de membranas es esencial en primer lugar aislar la membrana de interés. Cuando se someten las células eucarióticas a fuerzas mecánicas de cizalla sus membranas plasmáticas se desgarran y fragmentan liberando componentes citoplasmáticos y orgánulos unidos a membranas tales como mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y núcleos. Los fragmentos de la membrana plasmática y los orgánulos intactos pueden aislarse mediante las técnicas descritas en el Capítulo 1 (véase la Fig. 1-9) y en el Ejemplo Resuelto 2-1.

Las células poseen mecanismos para controlar las clases y cantidades de lípidos de membrana que sintetizan y dirigir, además, determinados lípidos a orgánulos concretos. Cada reino, cada especie, cada tejido o tipo celular así como los orgánulos dentro de un tipo determinado de célula tienen un conjunto característico de lípidos de membrana. La membrana plasmática, por ejemplo, está enriquecida en colesterol y esfingolípidos en cantidades detectables **(Fig. 11-2)**; las membranas mitocondriales interna son muy pobres en colesterol y esfingolípidos pero contienen la mayor parte del fosfatidilglicerol y la cardiolipina celular que se sintetizan en el interior de la mitocondria. Excepto en unos pocos casos se desconoce el significado funcional de estas combinaciones.

La composición proteica de membranas de orígenes diferentes varía aun más ampliamente que su composición lipídica lo que refleja su especialización funcional. Además, algunas proteínas de membrana están unidas a oligosacáridos de manera covalente. Por ejemplo, en la glucoforina, una glucoproteína de la membrana plasmática de eritrocito, el 60% de la masa consiste en oligosacáridos complejos unidos covalentemente a residuos aminoácidos específicos. Los residuos de Ser, Thr y Asn son los puntos de unión más comunes (véase la Fig. 7-30). Las porciones glucídicas de las glucoproteínas de la superficie influyen en el plegamiento de las proteínas, en su estabilidad, en el destino intracelular y su orientación en la membrana y juegan un papel importante en la unión específica de ligandos a los receptores glucoproteicos de la superficie (véase la Fig. 7-37).

Algunas proteínas de membrana están unidas de forma covalente a uno o más lípidos, que actúan como anclas hidrofóbicas, manteniendo las proteínas unidas a la membrana, tal como veremos.

TABLA 11-1 Componentes mayoritarios de las membranas plasmáticas en varios organismos

	Componentes (% en peso)				
	Proteína	Fosfolípido	Esterol	Tipo de esterol	Otros lípidos
Vaina de mielina humana	30	30	19	Colesterol	Galactolípidos, plasmalógenos
Hígado de ratón	45	27	25	Colesterol	—
Hoja de maíz	47	26	7	Sitosterol	Galactolípidos
Levadura	52	7	4	Ergosterol	Triacilgliceroles, ésteres esterólicos
Paramecium (protista ciliado)	56	40	4	Estigmasterol	—
E. coli	75	25	0	—	—

Nota: Los valores no suman 100% en todos los casos, porque hay otros componentes además de proteína, fosfolípidos y esteroles; las plantas, por ejemplo, tienen concentraciones elevadas de glucolípidos.

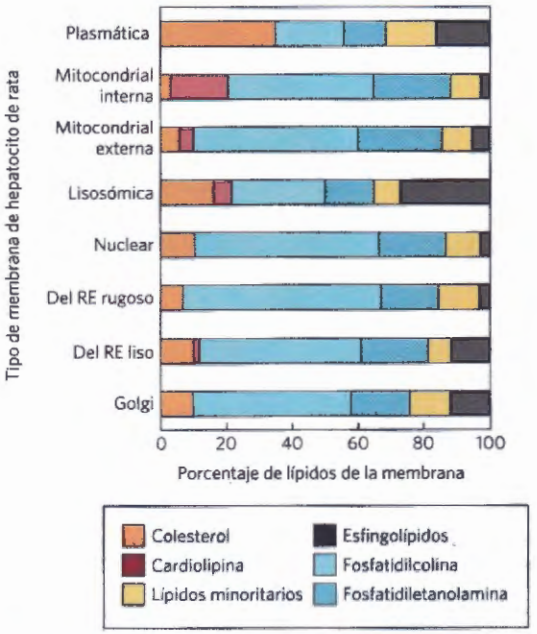


FIGURA 11-2 Composición lipídica de la membrana plasmática y de las membranas de los orgánulos de un hepatocito de rata. La especialización funcional de cada tipo de membrana se refleja en su composición lipídica característica. El colesterol es prominente en membranas plasmáticas pero es a penas detectable en membranas mitocondriales. La cardiolipina es un componente mayoritario de la membrana mitocondrial interna pero no de la membrana plasmática. La fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y el fosfatidilglicerol son componentes relativamente minoritarios de la mayoría de membranas pero desempeñan funciones críticas; el fosfatidilinositol y sus derivados, por ejemplo, son importantes en la transducción de señales desencadenas por hormonas. Los esfingolípidos, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina están presentes en la mayoría de membranas, pero en proporciones variables. Los glucolípidos, que son los componentes mayoritarios de las membranas de los cloroplastos de plantas, están prácticamente ausentes de las células animales.

Todas las membranas biológicas comparten ciertas propiedades fundamentales

Las membranas son impermeables a la mayoría de solutos polares o cargados, pero son permeables a los compuestos apolares. Tienen de 5 a 8 nm de grosor (50 a 80 Å) cuando se incluyen las proteínas que sobresalen a ambos lados. Las pruebas combinadas de microscopia electrónica y estudios de composición química así como estudios físicos de permeabilidad y del movimiento de moléculas individuales de proteínas y lípidos dentro de las membranas condujeron al **modelo de mosaico fluido** para la estructura de las membranas biológicas **(Fig. 11-3)**. Los fosfolípidos forman una bicapa, en la que las regiones apolares de las moléculas lipídicas de cada capa están encaradas hacia el centro de la bicapa y sus grupos de cabeza polares están encarados hacia el exterior interaccionando con la fase acuosa a cada lado. Las proteínas están incrustadas en esta hoja en bicapa, con sus dominios hidrofóbicos en contacto con las cadena acilo graso de los lípidos de la membrana. Algunas proteínas sobresalen a un solo lado de la membrana; otras tienen dominios expuestos a ambos lados. La orientación de las proteínas en la bicapa es asimétrica lo que confiere "lateralidad" a la membrana; los dominios

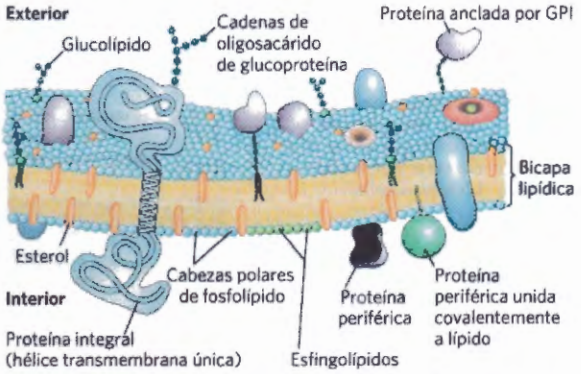


FIGURA 11-3 Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana. Las cadenas de acilo graso en el interior de la membrana forman una región hidrofóbica fluida. Las proteínas integrales flotan en este mar de lípidos, sostenidas por interacciones hidrofóbicas con sus cadenas laterales de aminoácidos apolares. Tanto las proteínas como los lípidos se pueden desplazar libremente en el plano de la bicapa, pero el movimiento de una cara de la bicapa a la otra está restringido. Las porciones de glúcido unidas a algunas proteínas y lípidos de la membrana plasmática están expuestas en la superficie extracelular.

proteicos expuestos a un lado de la bicapa son diferentes de los expuestos al otro lado lo que refleja una asimetría funcional. Los lípidos individuales y las unidades proteicas de una membrana forman un mosaico fluido con un patrón que, a diferencia de un mosaico de cerámica y mortero, puede cambiar constantemente. El mosaico de la membrana es fluido porque la mayoría de interacciones entre sus componentes son no covalentes, dejando libertad a las moléculas de lípidos y de proteínas para trasladarse lateralmente en el plano de la membrana.

Repasaremos ahora con más detalle algunas de estas características de la estructura de la membrana y consideraremos las pruebas experimentales que apoyan el modelo básico.

El elemento básico estructural de las membranas es una bicapa lipídica

Los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroles son prácticamente insolubles en agua. Cuando se mezclan con agua, forman espontáneamente agregados lipídicos microscópicos agrupándose con sus partes hidrofóbicas en contacto mientras que sus grupos hidrofílicos interactúan con el agua que los envuelve. Los agregados lipídicos disminuyen la superficie hidrofóbica expuesta al agua y así minimizan el número de moléculas en la capa de agua ordenada en la interfase lípido-agua (véase la Fig. 2-7), dando lugar así a un incremento de entropía. Este efecto hidrofóbico proporciona la fuerza termodinámica que impulsa la formación y mantenimiento de estos agregados de moléculas lipídicas. El término **interacciones hidrofóbicas** se usa a veces para describir la formación de agregados de superficies moleculares hidrofóbicas en un ambiente acuoso, pero debería quedar claro que las moléculas no interaccionan químicamente, sino que simplemente encuentran el ambiente de menor energía al reducir la superficie hidrofóbica, o apolar, expuesta al agua.

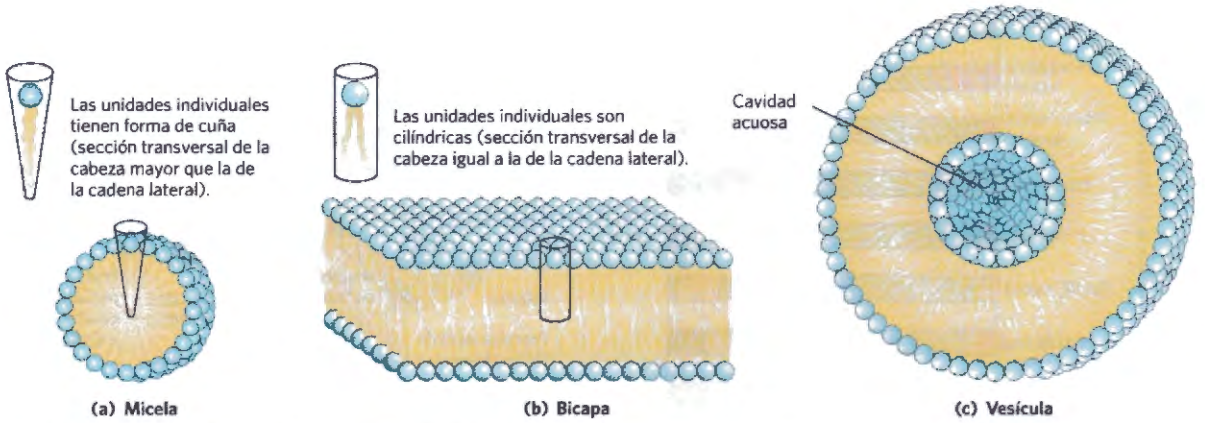


FIGURA 11-4 Agregados de lípidos anfipáticos que se forman en el agua. **(a)** En las micelas, las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos se hallan secuestradas en el núcleo de la esfera. No hay prácticamente agua en el interior hidrofóbico. **(b)** En una bicapa abierta, todas las cadenas laterales acilo excepto las que están en los bordes de la lámina están protegidas de la interacción con el agua. **(c)** Cuando una bicapa bidimensional se pliega sobre sí misma, forma una bicapa cerrada, una vesícula hueca tridimensional (liposoma) que encierra una cavidad acuosa.

En función de las condiciones precisas y de la naturaleza de los lípidos se forman tres tipos de agregados lipídicos cuando los lípidos anfipáticos se mezclan con agua **(Fig 11-4)**. Las **micelas** son estructuras esféricas que contienen entre unas pocas docenas y algunos miles de moléculas anfipáticas ordenadas con sus regiones hidrofóbicas hacia el interior, de donde queda excluida el agua, y sus grupos de cabeza hidrofílicos en la superficie, en contacto con el agua. La formación de las micelas está favorecida cuando el área de la sección transversal del grupo de cabeza es mayor que la de las cadenas laterales acílicas, tales como las de los ácidos grasos libres, lisofosfolípidos (fosfolípidos a los que les falta un ácido graso) y detergentes como el dodecilsulfato de sodio (SDS; véase la p.94).

Un segundo tipo de agregado lipídico en agua es la **bicapa**, en la cual dos monocapas de lípidos forman una hoja bidimensional. La formación de la bicapa tiene lugar fácilmente cuando la sección transversal del grupo de cabeza y las cadenas laterales acílicas son similares, como en el caso de glicerofosfolípidos y esfingolípidos. Las porciones hidrofóbicas en cada monocapa, excluidas del agua interaccionan entre sí. Los grupos de cabeza hidrofílicos interaccionan con el agua en cada superficie de la bicapa. Dado que las regiones hidrofóbicas en sus extremos (Fig. 11-4b) están en contacto con el agua, la hoja en bicapa es relativamente inestable y espontáneamente se repliega sobre sí misma formando una esfera hueca llamada **vesícula** o liposoma (Fig. 11-4c). La superficie continua de las vesículas elimina las regiones hidrofóbicas expuestas permitiendo que las bicapas alcancen máxima estabilidad dentro del entorno acuoso. La formación de vesículas también crea un compartimiento acuoso separado(la luz de la vesícula). Es probable que los precursores de las primeras células vivas se asemejaran a vesículas lipídicas, en las que su contenido acuoso se mantendría separado del exterior gracias a una capa hidrofóbica.

La bicapa lipídica tiene unos 3 nm (30 Å) de grosor. El núcleo hidrocarbonado formado por los grupos $—CH_2—$ y $—CH_3$ de los acilos grasos es tan apolar como el decano y las vesículas formadas en el laboratorio a partir de lípidos puros (liposomas) son prácticamente impermeables a los solutos polares al igual que la bicapa lipídica de las membranas biológicas (aunque estas últimas, tal como veremos, son permeables a los solutos para los que disponen de transportadores específicos).

La mayor parte de los lípidos y proteínas de la membrana se sintetizan en el retículo endoplasmático (RE), y de allí se desplazan a sus orgánulos de destino o a la membrana plasmática **(Fig. 11-5a)**. Durante este "tráfico de membranas" pequeñas vesículas membranosas emergen del RE y a continuación se trasladan hacia el Golgi cis al que se fusionan. A medida que lípidos y proteínas se trasladan a través del Golgi hacia su lado trans, experimentan una serie de alteraciones covalentes que determinan su localización final y su función en la célula. Por ejemplo, las cadenas de oligosacáridos o ácidos grasos tales como el palmitato se unen covalentemente a proteínas de membrana específicas, y los fosfolípidos experimentan reorganización de sus componentes ácido graso para llegar a sus formas maduras. En muchos casos, estas modificaciones dictan la localización final de la proteína modificada. El tráfico de membranas va acompañado de cambios importantes en la composición de lípidos y su disposición a través de la bicapa (Fig. 11-5b). La fosfatidilcolina es el principal lípido en la monocapa luminal de la membrana del Golgi, pero en las vesículas de transporte que abandonan el Golgi trans, la fosfatidilcolina ha sido reemplazada en gran parte por esfingolípidos y colesterol, los cuales después de la fusión de las vesículas de transporte con la membrana plasmática, constituyen la mayor parte de la membrana celular. Los lípidos de la membrana plasmática son asimétricos en su distribución entre las dos monocapas de la bicapa. En la membrana plasmática de las células eucarióticas, por ejemplo, los lípidos que contienen colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) se encuentra principalmente en la cara externa de la bicapa (extracelular o exoplasmática), mientras que fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y los fosfatidilinositoles se encuentran casi de forma exclusiva en la cara interna (citoplasmática), en donde los grupos de cabeza cargados negativamente de la serina y el inositol fosfato pueden interaccionar

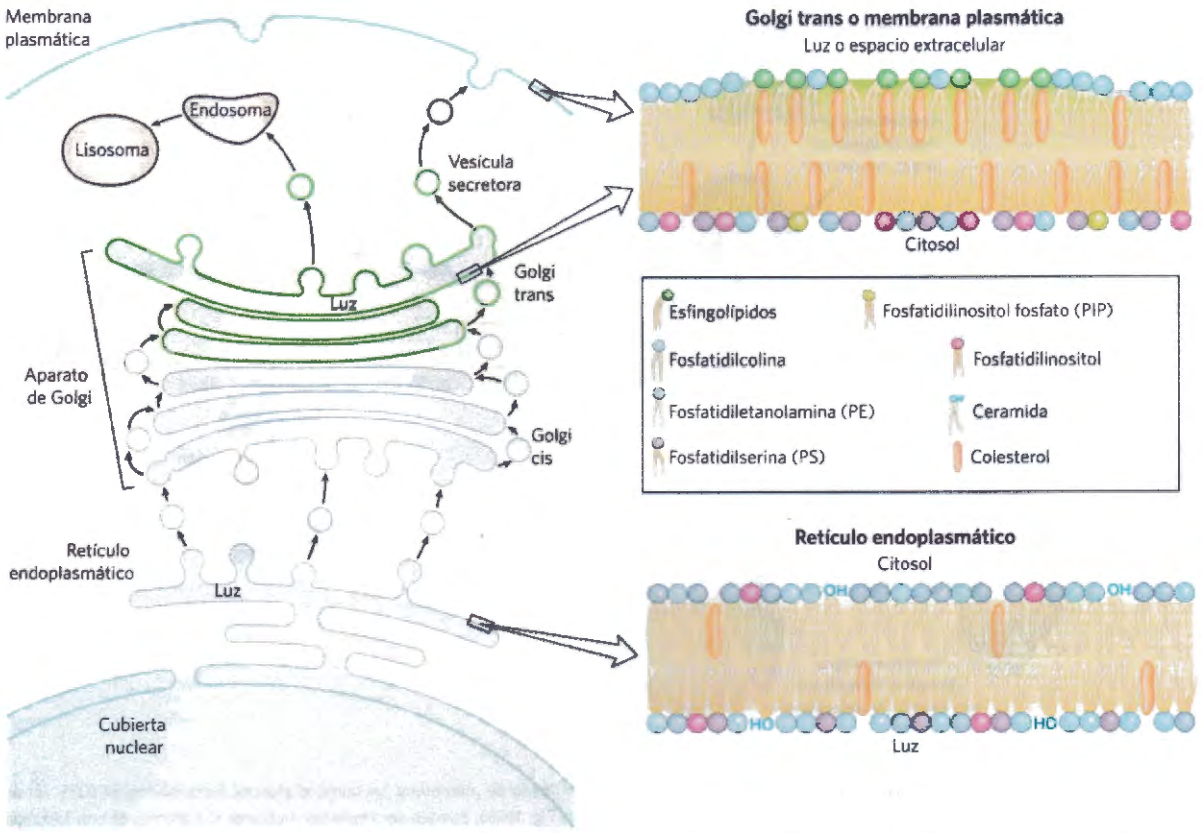


FIGURA 11-5 Cambios de composición que acompañan el tráfico de membranas. **(a)** La ruta de los lípidos y proteínas durante su paso por las membranas desde el sitio de síntesis (RE) a través del aparato de Golgi a la superficie celular (o a orgánulos tales como los lisosomas). Se forman pequeñas vesículas fuera del RE, se desplazan y se fusionan con el Golgi cis y salen por el Golgi trans en forma de vesículas de transporten que se fusionan con la membrana plasmática o con los endosomas, que dan lugar a los lisosomas. **(b)** Durante este tráfico hay cambios notables tanto la composición de lípidos de la bicapa como la disposición de lípidos específicos entre las caras interna y externa. [Fuente: (b) Información de G. Drin, *Annu. Rev. Biochem* 83:51, 2014, Fig. 1.]

electrostáticamente con regiones cargadas positivamente de proteínas de membrana periféricas o anfitrópicas (descritas más adelante). Una segunda ruta para la redistribución de lípidos desde su sitio de síntesis a su membrana de destino es mediante conductos especializados accionados por proteínas, denominados uniones, entre los que se incluyen las uniones entre RE y la membrana plasmática y las uniones RE-mitocondria.

Un método utilizado anteriormente para determinar la distribución en la bicapa de un fosfolípido específico de la membrana plasmática consistía en tratar la célula intacta con fosfolipasa C, la cual no puede llegar a los lípidos de la monocapa (cara) interna pero que elimina los grupos de cabeza de los lípidos en la monocapa exterior. La proporción de cada grupo de cabeza liberado proporcionaba una valoración de la fracción de cada lípido en la monocapa exterior de la membrana plasmática. Hoy en día, la localización de los lípidos individuales en la membrana plasmática u otras membranas celulares puede determinarse, con mayor precisión, utilizando métodos que emplean análogos fluorescentes de lípidos o derivados fluorescentes de anticuerpos, toxinas o dominios de unión a lípidos que tienen una afinidad y especificidad de unión por un tipo de lípido. La localización de las sondas unidas se determina mediante microscopia de fluorescencia.

Los cambios, a lo largo del tiempo, en la distribución de lípidos entre las hojas, o monocapas, de la membrana plasmática tienen consecuencias biológicas. Por ejemplo, sólo cuando la fosfatidilserina de la membrana plasmática pasa a la cara externa puede una plaqueta realizar su papel en la formación de un coágulo sanguíneo. Para muchos otros tipos de células, la exposición de la fosfatidilserina en la superficie externa marca una célula para su destrucción por muerte celular programada. El movimiento de las moléculas de fosfolípido de una capa a la otra está catalizado y regulado por proteínas específicas (véase la Fig. 11-15)

Tres tipos de proteínas de membrana difieren en la naturaleza de su asociación con la misma

Las **proteínas integrales de membrana** están están incrustadas en la bicapa lipídica y sólo se pueden liberar por la acción de agentes que superan el efecto hidrofóbico tales como detergentes, disolventes orgánicos o desnaturalizantes **(Fig 11-6)**. Las proteínas integrales pueden ser **monotópicas**, que interaccionan con una sola hoja de la bicapa, o **politópicas**, que tienen una cadena polipeptídica que atraviesa la membrana una o varias veces. Las **proteínas periféricas de membrana** se asocian con la membrana a través de interacciones electroestáticas y enlaces de hidrógeno

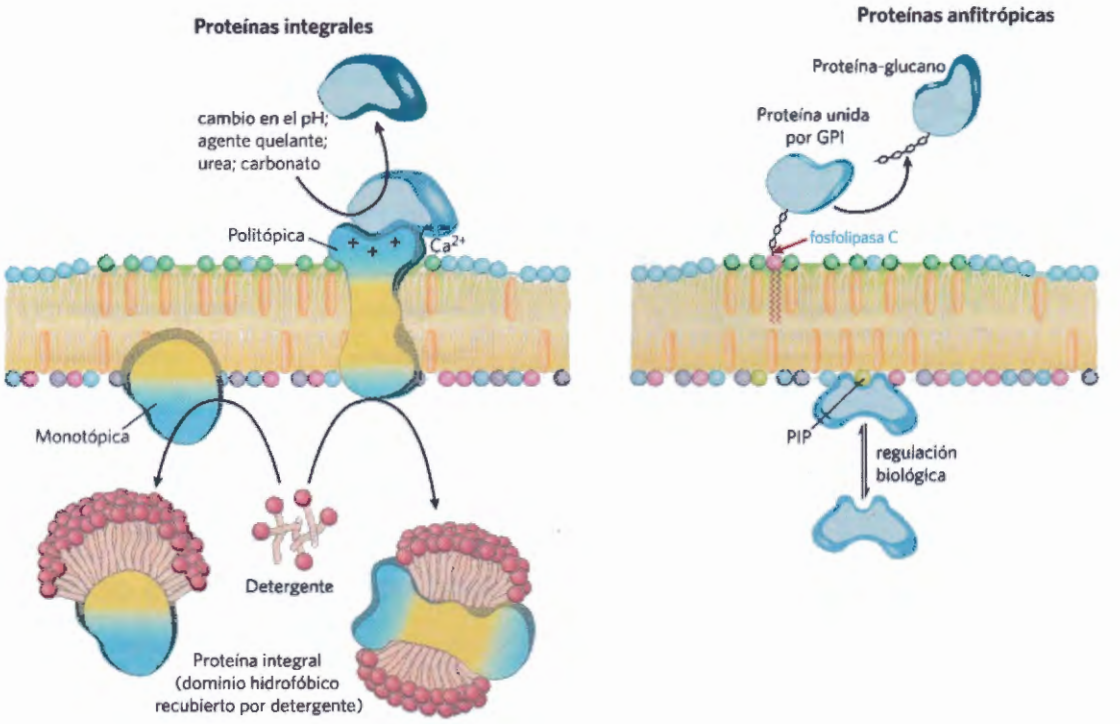


FIGURA 11-6 Proteínas periféricas, integrales y anfitrópicas. Las proteínas de membrana se pueden distinguir operacionalmente por las condiciones requeridas para liberarlas de la membrana. Las proteínas integrales, tanto las monotópicas (asociadas a una hoja)l como las politópicas (transmembrana) pueden ser extraídas con detergentes, que destruyen las interacciones hidrofóbicas dentro de la bicapa lipídica y forman agrupaciones parecidas a micelas alrededor de moléculas proteicas individuales. Las proteínas integrales unidas covalentemente a un lípido de membrana, tal como el glucosil fosfatidilinositol (GPI; véase la Fig. 11-13), pueden ser liberadas mediante el tratamiento con fosfolipasa C. La mayoría de las proteínas periféricas se pueden liberar por cambios en el pH o en la fuerza iónica, eliminación de Ca^{2+} por un agente quelante, o la adición de urea o carbonato.Las proteínas anfitrópicas están unas veces asociadas con membranas y otras no, según algún tipo de proceso regulador tal como la palmitilación reversible.

con los dominios hidrofílicos de las proteínas integrales y con lípidos de membrana. En el laboratorio pueden liberarse de su asociación con la membrana mediante tratamientos relativamente suaves que interfieren con las interacciones electroestáticas o rompen los puentes de hidrógeno; un agente utilizado habitualmente es el carbonato a pH elevado. Las **proteínas anfitrópicas** se asocian de modo reversible con membranas y se encuentran, por consiguiente, tanto en el citosol como asociadas a membranas. Su afinidad por las membranas proviene, en algunos casos, de las interacciones no covalentes de la proteína con una proteína o lípido de membrana, y en otros casos de la presencia de uno o más lípidos unidos covalentemente a la proteína anfitrópica (véase la Fig. 11-13). Generalmente, la asociación reversible de proteínas anfitrópicas con la membrana está regulada; por ejemplo, la fosforilación o la unión de un ligando puede producir un cambio conformacional en la proteína que da lugar a la exposición de un sitio de unión a membrana que, previamente, era inaccesible. La unión covalente reversible de na o más porciones de lípido pueden efectuar, también, un cambio en la afinidad de una proteína anfitrópica por la membrana.

Muchas proteínas integrales de membrana abarcan la bicapa lipídica

La topología de las proteínas de membrana (localización de los dominios proteicos relativa a la bicapa lipídica) puede ser investigada con reactivos que reaccionan con las cadenas laterales de la proteína pero que no pueden cruzar la membrana (reactivos químicos polares que reaccionan con aminas primarias de residuos Lys, por ejemplo, o enzimas como la tripsina que corta proteínas pero que no puede cruzar la membrana). Por ejemplo, la tripsina corta los dominios extracelulares pero no afecta a los dominios que permanecen sepultados dentro de la bicapa o expuestos solamente en la superficie interior a menos que se rompa la membrana plasmática y estos dominios sean accesibles al enzima.

Experimentos clásicos con tales reactivos con especificidad topológica muestran que la glucoproteína del eritrocito **glucoforina** abarca la totalidad de la membrana plasmática. Su dominio amino-terminal (portador de las cadenas de glúcidos) se encuentra en la superficie externa y puede cortarse con tripsina. El extremo carboxi-terminal sobresale hacia el interior de la célula donde no puede reaccionar con reactivos impermeables. Tanto el dominio amino-terminal como el carboxi-terminal contienen muchos residuos aminoácidos polares o cargados y son, por tanto, hidrofílicos. No

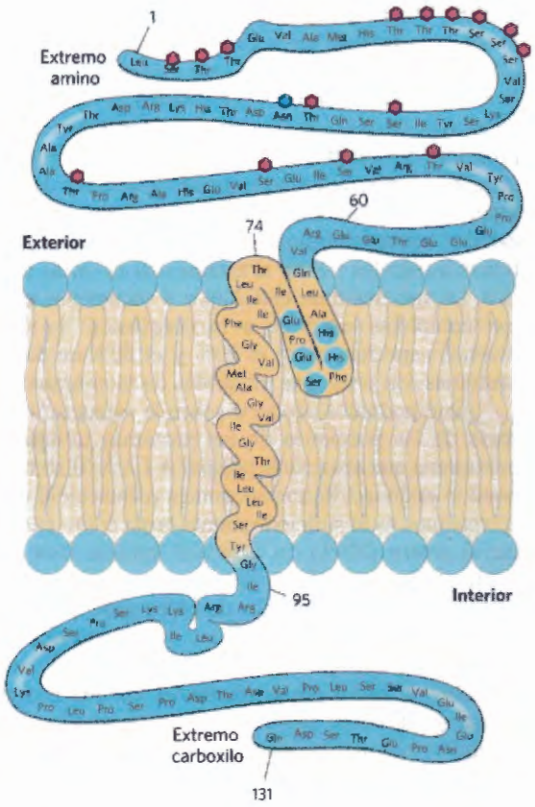


FIGURA 11-7 Disposición transbicapa de la glucoforina en el eritrocito. Un dominio hidrofílico, que contiene todos los residuos de azúcar, se encuentra en la superficie externa y otro dominio hidrofílico sobresale desde la cara interna de la membrana. Cada hexágono rojo representa un tetrasacárido (que contiene dos Neu5Ac (ácido siálico), Gal y GalNAc) unido por *O* a un residuo Ser o Thr; el hexágono azul representa un oligosacárido unid por *N* a un residuo de Asn. El tamaño relativo de las unidades de oligosacárido es mayor que el que aquí se muestra. Un segmento de 19 residuos hidrofóbicos (residuos del 75 al 93) forman una hélice α que atraviesa la bicapa de la membrana (véase la Fig. 11-12a). El segmento desde el residuo 64 al 74 tiene algunos residuos hidrofóbicos y probablemente, tal como se muestra, penetra en la cara externa de la bicapa lipídica. [Fuente: Information from V. T. Marchesi et al., *Annu. Rev. Biochem.* 45:667, 1976.]

obstante, hay un segmento en el centro de la proteína (residuos 75 a 93) que contiene mayoritariamente residuos aminoácidos hidrofóbicos lo que sugiere que la glucoforina tiene un segmento transmembrana ordenado tal como se muestra en la **Figura 11-7**. Rigurosos estudios físicos y químicos han confirmado esta topología de la glucoforina y han establecido la topología de otras muchas proteínas de membrana.

Estos estudios topológicos también revelaron que la orientación de la glucoforina en la membrana es asimétrica: su segmento amino-terminal se encuentra *siempre* en el exterior. Estudios similares con otras muchas proteínas integrales de membrana muestran que cada una tiene una orientación específica en la bicapa lo que le comunica una lateralidad determinada. En el caso de la glucoforina y en el de todas las glucoproteínas de la membrana plasmática los dominios glucosilados están situados invariablemente en la superficie extracelular de la bicapa. Tal como veremos, el ordenamiento asimétrico de las proteínas de membrana les confiere asimetría funcional. Todas las moléculas de una bomba iónica determinada, por ejemplo, tienen la misma orientación en la membrana por lo que todas ellas bombean los iones en la misma dirección.

Regiones hidrofóbicas de proteínas integrales de membrana se asocian con lípidos de membrana

La unión firme de las proteínas integrales a las membranas es el resultado del efecto hidrofóbico: el desplazamiento de los dominios hidrofóbicos de las proteínas desde el contacto con los lípidos de membrana hasta el contacto con el ambiente acuoso tendría un alto coste termodinámico. En algunas proteínas politópicas existe una sola secuencia hidrofóbica en el centro de la molécula (tal como sucede en la glucoforina) o en el extremo amino o carboxilo. Otras tienen múltiples secuencias hidrofóbicas, y cada una de ellas, cuando adoptan conformación de hélice α, tiene una longitud suficiente (unos 20 residuos) para abarcar la bicapa lipídica. (Recuerde del Ejemplo Práctico 4-1 que cada residuo en una hélice α añade 1,5 Å a su longitud).

Una de las proteínas politópicasmejor estudiada es la bacteriorrodopsina que contiene siete secuencias internas muy hidrofóbicas y que abarca siete veces la bicapa lipídica. La bacteriorrodopsina es una bomba de protones accionada por la luz que está densamente empaquetada en formaciones regulares en la membrana púrpura de la bacteria *Halobacterium salinarum*. La cristalografía de rayos X revela una estructura con siete segmentos α-helicoidales, cada uno de los cuales atraviesa la bicapa lipídica y que están conectados mediante bucles no helicoidales en las caras externa e interna de la membrana **(Fig. 11-8)**. En la secuencia de aminoácidos de la bacteriorrodopsina pueden identificarse siete segmentos de unos 20 residuos hidrofóbicos, cada uno de ellos de longitud suficiente para formar una hélice α que abarca la bicapa. Las siete hélices están agrupadas

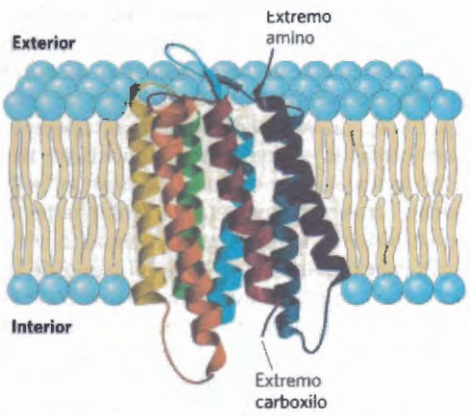


FIGURA 11-8 Bacteriorrodopsina, una proteína que abarca la membrana. (PDB ID 2AT9) La cadena polipeptídica sencilla se pliega en siete hélices α hidrofóbicas, cada una de las cuales atraviesa la bicapa lipídica de forma aproximadamente perpendicular al plano de la membrana. Las siete hélices transmembrana están agrupadas, y el espacio alrededor y entre ellas se llena con las cadenas acilo de los lípidos de membrana. El retinal que es un pigmento que absorbe luz (véase la Fig. 10-20) está sepultado muy en el interior de la membrana en contacto con varios de los segmentos helicoidales (no mostrados). Las hélices están coloreadas para corresponder con la gráfica hidropática de la Figura 11-10b. [Fuente: PDB ID 2AT9, K. Mitsuoka et al., *J. Mol. Biol.* 286:861, 1999.]

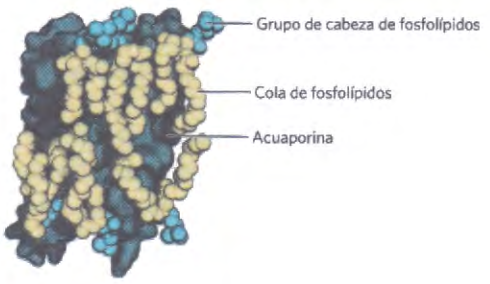


FIGURA 11-9 Anillos lipídicos asociados con una proteína integral de membrana. La estructura cristalina de la acuaporina de oveja, un canal de agua transmembrana, incluye una capa de fosfolípidos situados con sus grupos de cabeza (azul) en las posiciones esperadas en las superficies interna y externa de la membrana y con sus cadenas acilo hidrofóbicas (dorado) íntimamente asociadas con la superficie de la proteína expuesta a la bicapa. El lípido forma un "sello graso" alrededor de la proteína, la cual se representa como una superficie azul oscuro. [Fuente: PDB ID 2B6O, T. Gonen et al., *Nature* 438:633, 2005.]

y se orientan en forma no completamente perpendicular al plano de la bicapa patrón que (tal como veremos en el capítulo 12) es un motivo muy común en las proteínas de membrana que intervienen en la recepción de señales. El efecto hidrofóbico mantiene a los aminoácidos apolares firmemente anclados entre los grupos acilo graso de los lípidos de la membrana.

Una vez resueltas sus estructuras por cristalografía se ha encontrado que muchas proteínas de membrana incluyen moléculas de fosfolípidos unidas; se considera que estos están posicionados en las membranas nativas en la misma forma que en los cristales de proteína. Gran parte de estas moléculas de fosfolípidos se encuentran en la superficie de la proteína, con sus grupos de cabeza interaccionando con residuos aminoácidos polares en las interfases agua-membrana interior y exterior mientras que las cadenas laterales están asociadas con residuos apolares. Estos **lípidos anulares** forman una envoltura en bicapa (annulus) alrededor de la proteína, que está orientada aproximadamente de la forma que sería de esperar para los fosfolípidos en una bicapa **(Fig. 11-9)**. En las interfases entre monómeros de proteínas formadas por múltiples subunidades se encuentran otros fosfolípidos en donde forman un "sello graso". Además, otros están incrustados profundamente dentro de una proteína de membrana, a menudo con sus grupos de cabeza muy por debajo del plano de la bicapa. Por ejemplo, la citocromo oxidasa (Complejo IV que se encuentra en la mitocondria) tiene 13 moléculas visibles en la estructura cristalina: dos cardiolipinas, una fosfatidilcolina, tres fofatidiletanolaminas, cuatro prostaglandinas y tres triacilgliceroles, cada una unida a un sitio específico de la oxidasa. Algunos sitios son internos, peero la mayoría de las 13 moléculas lipídicas tienen la localización y orientación de lípidos de bicapa.

A partir de su secuencia puede predecirse a veces la topología de una proteína integral de membrana

Determinar la estructura tridimensional de una proteína de membrana, o sea, su topología, es, generalmente, mucho más difícil que determinar su secuencia aminoacídica, ya sea directamente o por secuenciación de su gen. Se conocen miles de secuencias de proteínas de membrana, pero se han establecido relativamente pocas estructuras tridimensionales por cristalografía de rayos X o espectroscopia RMN. La presencia de secuencias continuas de más de 20 residuos hidrofóbicos en una proteína de membrana se toma generalmente como prueba de que tales secuencias atraviesan la bicapa lipídica, actuando como anclas hidrofóbicas o formando canales transmembrana. Prácticamente todas las proteínas integrales tienen al menos una de estas secuencias. La aplicación de esta lógica a secuencias genómicas completas conduce a la conclusión de que en muchas especies, entre el 20% y el 30% de todas las proteínas son proteínas integrales de membrana.

¿Qué podemos predecir sobre la estructura secundaria de las porciones de las proteínas integrales de membrana que abarcan la bicapa? A 1,5 Å (0,15 nm) por residuo aminoácido una secuencia α-helicoidal de 20 a 25 residuos es lo suficientemente larga como para abarcar el grosor (30 Å) de la bicapa lipídica. Una cadena polipeptídica rodeada de lípidos, sin moléculas de agua con las que formar enlaces de hidrógeno, tiende a formar hélices α u hojas β, en las que se maximizan los enlaces de hidrógeno intracatenarios. Si las cadenas laterales de todos los aminoácidos en una hélice son apolares, el efecto hidrofóbico con el entorno lipídico estabiliza aun más la hélice.

Varios métodos sencillos de análisis de secuencia de aminoácidos proporcionan una predicción de estructura secundaria bastante precisa para las proteínas transmembrana. La polaridad relativa de cada aminoácido se determina experimentalmente midiendo la variación de energía libre que se produce cuando la cadena lateral del residuo pasa de un disolvente hidrofóbico a agua. Esta energía libre de transferencia, que se puede expresar como un **índice hidropático** (véase la Tabla 3-1), va desde ser muy exergónica para residuos muy polares o cargados a muy endergónica para aminoácidos con cadenas laterales aromáticas o hidrocarbonadas alifáticas. El índice hidropático global (hidrofobicidad) de una secuencia de aminoácidos se calcula sumando las energías libres de transferencia de los residuos en la secuencia. Para localizar segmentos en una secuencia polipeptídica con el potencial para abarcar la membrana, se calculan los índices hidropáticos de segmentos sucesivos (llamados ventanas) de un tamaño determinado que oscila entre 7 y 20 residuos. Para una ventana de 7 residuos, por ejemplo, los índices promedio para los residuos del 1 al 7, del 2 al 8, del 3 al 9, etc..., se representan tal como se indica en la **Figura 11-10** (se muestra el índice para el residuo del medio en cada ventana, el 4 por ejemplo en la ventana 1-7). Una región con más de 20 residuos con alto índice hidropático es, presumiblemente, un segmento transmembrana. Cuando las secuencias de proteínas de membrana de conocida estructura tridimensional se analizan de esta manera se observa una correspondencia bastante buena entre las predicciones y los segmentos que se sabe abarcan la membrana. Los análisis hidropáticos predicen un solo segmento hidrofóbico en hélice para la glucoforina (Fig. 11-10a) y siete segmentos transmembrana para la bacteriorrodopsina (Fig. 11-10b), en concordancia con las estructuras conocidas mediante cristalografía de rayos x.

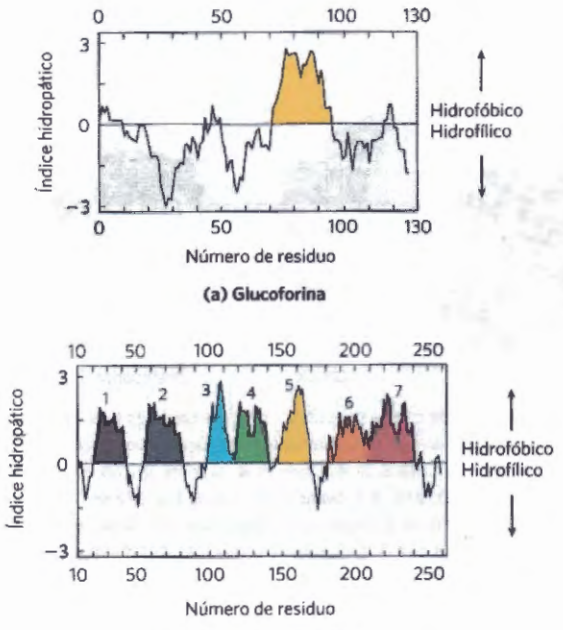


FIGURA 11-10 Gráficas hidropáticas. El índice hidropático (véase la Tabla 3-1) se representa frente al número de residuo para dos proteínas integrales de membrana. El índice hidropático para cada residuo aminoácido en una secuencia de longitud definida (llamada ventana) se utiliza para calcular la hidropatía promedio de los residuos en esta ventana. El eje horizontal muestra el número de residuo de la mitad de la ventana. **(a)** La glucoforina de eritrocitos humanos tiene una única secuencia hidrofóbica entre los residuos 75 y 93 (amarillo); compare esto con la Figura 11-7. **(b)** La bacteriorrodopsina, de la que se sabe por estudios físicos independientes que tiene siete hélices transmembrana (véase la Fig. 11-8), tiene siete regiones hidrofóbicas. Observe, sin embargo, que la gráfica hidropática es ambigua en la región de los segmentos 6 y 7. La cristalografía de rayos X ha confirmado que esta región tiene dos segmentos transmembrana.

No todas las proteínas integrales de membrana están formadas por hélices α transmembrana. Otro motivo estructural también común en las proteínas de membrana bacterianas es el **barril** β (véase la Fig. 4-18b), en el que 20 o más segmentos transmembrana forman hojas β que recubren la parte interior de un cilindro **(Fig. 11-11)**. Los mismos factores que favorecen la formación de hélices α en el interior hidrofóbico de una bicapa lipídica, también estabilizan los barriles β: cuando no hay moléculas de agua disponibles para formar enlaces de hidrógeno con el oxígeno carbonílico y el nitrógeno del enlace peptídico, la formación máxima de puentes de hidrógeno intracatenarios da lugar a la conformación más estable. Las hojas β planas no maximizan estas interacciones por lo que no se encuentran generalmente en el interior de la membrana; los barriles β permiten todos los enlaces de hidrógeno posibles y son, aparentemente, frecuentes en las proteínas de membrana. Las **porinas**, proteínas que permiten el paso de ciertos solutos polares a través de la membrana externa de bacterias gram-negativas como, por ejemplo, *E. coli*, presentan barriles β de múltiples cadenas que forran el paso transmembrana polar. Las membranas exteriores de mitocondrias y cloroplastos también contienen una diversidad de barriles β, quizá como resultado del origen endosimbiótico bacteriano de mitocondrias y cloroplastos.

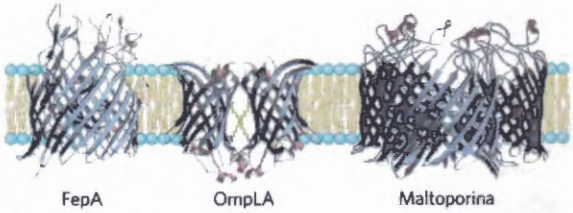


FIGURA 11-11 Proteínas de membrana con estructura en barril β. Se muestran tres proteínas de la membrana externa de *E. coli* vistas desde el plano de la membrana. FepA, que interviene en la captación de hierro, tiene 22 cadenas β que abarcan la membrana. La fofolipasa A de la membrana exterior (en inglés outer membrane phosphoolipase A), o OmpLA, una fosfolipasa, es un barril β de 12 cadenas que se encuentra en forma de dímero en la membrana. La maltoporina, un transportador de maltosa, es un trímero; cada monómero está constituido por 16 cadenas β. [Fuentes: FepA: PDB ID 1FEP, S. K. Buchanan et al., *Nature Struct. Biol.* 6:56, 1999. OmpLA: modificado de PDB ID 1QD5, H. J. Snijder et al., *Nature*, 401:717, 1999. Maltoporina, modificado de PDB ID 1MAL, T. Schirmer et al., *Science*, 267:512, 1995.]

Un polipéptido es más extendido en la conformación β que en una hélice α; entre 7 y 9 residuos en una conformación β son necesarios para atravesar la membrana. Recuerde que en la conformación β, las cadenas laterales se alternan a uno y otro lado de la hoja (véase la Fig. 4-6). En las cadenas β de las proteínas de membrana, cada segundo residuo del segmento transmembrana es hidrofóbico e interacciona con la bicapa lipídica; en la interfase lípido-proteína es frecuente encontrar cadenas laterales aromáticas. Los demás residuos pueden ser o no hidrofílicos. La gráfica hidropática no es útil para predecir segmentos transmembrana en el caso de proteínas con motivos de barril β, pero a medida que aumenta la base de datos de barriles β conocidos, es factible hacer predicciones de conformaciones β transmembrana basadas en la secuencia. Por ejemplo, se ha predicho correctamente, por análisis de secuencia, que algunas proteínas de la membrana externa de bacterias gram-negativas (Fig. 11-14) contienen barriles β.

Otra característica notable de muchas proteínas transmembrana de estructura conocida es la presencia de residuos Tyr y Trp en la interfase entre lípido y agua **(Fig. 11-12)**. Las cadenas laterales de estos residuos sirven, aparentemente, como anclas de la interfase de la membrana, capaces de interaccionar simultáneamente con la fase lipídica central y con las fases acuosas a ambos lados de la membrana. Otra generalización acerca de la localización de aminoácidos con respecto a la bicapa es la **regla de positivo en el interior**: los residuos de Lys, His y Arg cargados positivamente de las proteínas de membrana se encuentran más frecuentemente en el lado citoplasmático de las membranas.

Lípidos unidos covalentemente anclan algunas proteínas de membrana

Algunas proteínas de membrana están unidas covalentemente a uno o más lípidos, que pueden ser de varios tipos: ácidos grasos de cadena larga, isoprenoides, esteroles o derivados glucosilados del fosfatidilinositol, (GPI; **Fig 11-13**). El lípido unido proporciona un anclaje hidrofóbico a la proteína que la inserta en la bicapa lipídica y mantiene la proteína en la superficie de la membrana. La fuerza de la interacción hidrofóbica entre

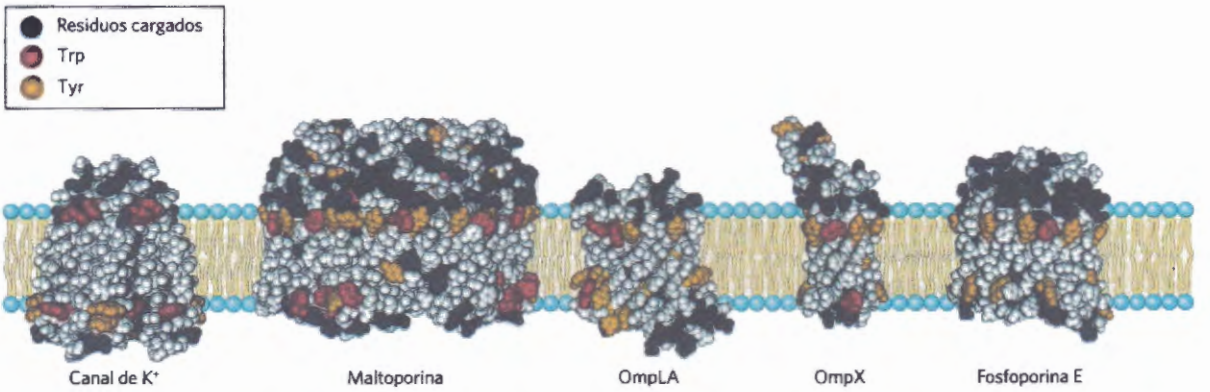


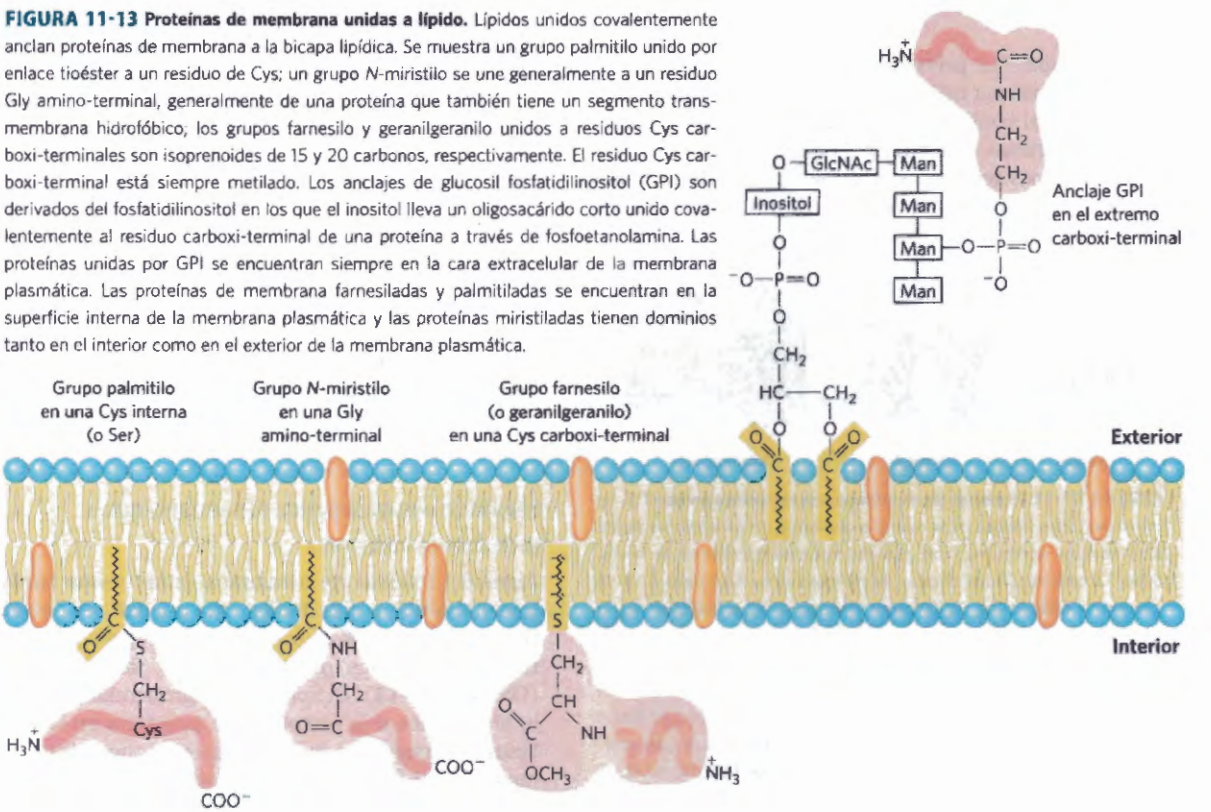
FIGURA 11-12 Agrupamiento de residuos Tyr y Trp de proteínas de membrana en la interfase agua-lípido. Se conocen las estructuras detalladas de estas cinco proteínas integrales de membrana a partir de estudios cristalográficos. El canal de K^+ es de la bacteria *Streptomyces lividans* (véase la Fig. 11-45); la maltoporina, OmpLA, OmpX y la fosfoporina E son proteínas de la membrana externa de *E. coli*. Los residuos de Tyr y Trp se encuentran predominantemente en el punto en que las regiones apolares de las cadenas acilo se encuentran con la región de los grupos de cabeza polares. Los residuos cargados (Lys, Arg, Glu, Asp) se encuentran casi exclusivamente en las fases acuosas. [Fuentes: Canal de K^+, PDB ID 1BL8, D. A. Doyle et al., *Science* 280:69, 1998. Maltoporina: PDB ID 1AF6, Y. F. Wang et al., *J. Mol. Biol.* 272:56, 1997. OmpLA: PDB ID 1QD5, H. J. Snijder et al., *Nature* 401:717, 1999. OmpX : PDB ID 1QJ9, J. Vogt and G. E. Schulz, *Structure* 7:1301, 1999. Fosforina E: PDB ID 1PHO, S. W. Cowan et al., *Nature* 358:727, 1992.]

una bicapa y una cadena hidrocarbonada simple unida a una proteína es suficiente para anclar la proteína de forma segura, si bien muchas proteínas tienen más de una porción lipídica unida. Además, otras interacciones tales como atracciones iónicas entre residuos Lys de la proteína cargados positivamente y grupos de cabeza polares de lípidos cargados negativamente, pueden colaborar al efecto de anclaje de un lípido unido covalentemente. Por ejemplo, la proteína de la membrana plasmática MARCKS, que interacciona con filamentos de actina en el proceso de la motilidad celular tiene una porción miristilo unida covalentemente, pero también contiene la secuencia

KKKKKRFSFKKSFKLSGFSFKKNKK
151 175

que aumenta la afinidad de la proteína por la membrana. Tres agrupamientos de residuos Lys y Arg cargados positivamente (sombreados en azul) interaccionan con los grupos de cabeza cargados negativamente del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en la cara citoplasmática de la membrana plasmática; cinco residuos aromá-

FIGURA 11-13 Proteínas de membrana unidas a lípido. Lípidos unidos covalentemente anclan proteínas de membrana a la bicapa lipídica. Se muestra un grupo palmitilo unido por enlace tioéster a un residuo de Cys; un grupo *N*-miristilo se une generalmente a un residuo Gly amino-terminal, generalmente de una proteína que también tiene un segmento transmembrana hidrofóbico; los grupos farnesilo y geranilgeranilo unidos a residuos Cys carboxi-terminales son isoprenoides de 15 y 20 carbonos, respectivamente. El residuo Cys carboxi-terminal está siempre metilado. Los anclajes de glucosil fosfatidilinositol (GPI) son derivados del fosfatidilinositol en los que el inositol lleva un oligosacárido corto unido covalentemente al residuo carboxi-terminal de una proteína a través de fosfoetanolamina. Las proteínas unidas por GPI se encuentran siempre en la cara extracelular de la membrana plasmática. Las proteínas de membrana farnesiladas y palmitiladas se encuentran en la superficie interna de la membrana plasmática y las proteínas miristiladas tienen dominios tanto en el interior como en el exterior de la membrana plasmática.



ticos (sombreados en amarillo)se insertan en la bicapa lipídica. Cuando los fosfatos del grupo de cabeza PIP_2, se eliminan enzimáticamente, MARCKS pierde su unión con la membrana plasmática y se disocia.

Además de anclar una proteína en la membrana el lípido unido podría tener una función más específica. En la membrana plasmática, las **proteínas con anclas GPI** se presentan exclusivamente en la cara externa y están confinadas dentro de agrupamientos, tal como veremos (véase la p. 401), mientras que otros tipos de proteínas unidas a lípidos (con grupos farnesilo o geranilgeranilo unidos; Fig. 11-13) se encuentran exclusivamente en la cara interior. En las células epiteliales polarizadas (como por ejemplo las células epiteliales del intestino, véase la Fig. 11-41) en las que las superficies apical y basal tienen funciones diferentes, las proteínas unidas por GPI se dirigen específicamente a la superficie apical. La unión de un lípido específico a una proteína de membrana recién sintetizada tiene, por tanto, una función de orientación, dirigiendo la proteína a su correcta localización en la membrana.

Las proteínas anfitrópicas se asocian de manera reversible con la membrana

Algunas proteínas anfitrópicas contienen un dominio PH (homología con la pleckstrina), una bolsa de fijación que une específicamente fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3), y que está localizado en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. El PIP_3 se sintetiza y degrada en respuesta a señales hormonales y a otras señales. Otro dominio proteico conservado, SH2 (homolgía con Src), une proteínas de membrana con residuos de tirosina fosforilada (fosfotirosina), pero no con la forma sin fosforilar. (Los dominios PH y SH2 se discuten con más detalle en el Capítulo 12). Así, la asociación de muchas proteínas anfitrópicas con la membrana plasmática se puede controlar de modo reversible mediante la adición o eliminación enzimática de un solo grupo fosforilo del fosfatidilinositol o de un residuo Tyr de la proteína. La asociación transitoria de proteínas específicas con la membrana es de vital importancia en muchas rutas de señalización. Cuando dos o más proteínas han de interaccionar en un acto de señalización, confinarlas al espacio bidimensional de la superficie de la membrana hace que su interacción sea mucho más probable.

RESUMEN 11.1 Composición y arquitectura de las membranas

- Las membranas biológicas definen los límites celulares, dividen las células en compartimientos discretos, organizan secuencias de reacciones complejas y actúan en la recepción de señales y en transformaciones de energía.
- Las membranas se componen de lípidos y proteínas en una combinación variable y determinada para cada especie, tipo de célula y orgánulo. El modelo de mosaico fluido, con una bicapa lipídica como unidad estructural básica, proporciona una visión simplificada y general de las membranas.
- El tráfico de membranas es el desplazamiento de componentes de la membrana desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, y a su través, donde se marcan para su destino final mediante alteraciones covalentes.
- Las proteínas integrales de membrana están incrustadas en las membranas con sus cadenas laterales de aminoácidos apolares estabilizadas por contacto con la bicapa lipídica y no con la fase acuosa de su alrededor. Las proteínas periféricas de membrana están asociadas débilmente a la membrana por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con fosfolípidos y protéinas integrales de la membrana. Las proteínas anfitrópicas se asocian reversiblemente con las membranas en respuesta a señales biológicas tales como la fosforilación de lípidos o proteínas de la membrana o por eliminación de lípidos unidos covalentemente.
- Muchas proteínas de membrana abarcan la bicapa lipídica varias veces, con secuencias hidrofóbicas de, aproximadamente, 20 residuos aminoácidos formando hélices α transmembrana. Los barriles β multicadena son también comunes en las proteínas integrales de membrana bacterianas. Residuos Tyr y Trp de proteínas transmembrana se hallan a menudo en la interfase lípido-agua.
- Algunas proteínas de membrana tiene lípidos unidos covalentemente que intervienen en su interacción con la bicapa.

11.2 Dinámica de membranas

Una característica notable de todas las membranas biológicas es su plasticidad, es decir, su capacidad de cambiar de forma sin perder su integridad ni dejar salir sus contenidos. La base de esta propiedad se encuentra en las interacciones no covalentes entre lípidos de la bicapa y los movimientos permitidos a los lípidos individuales ya que no están unidos entre sí de forma covalente. Analizamos seguidamente la dinámica de las membranas: los movimientos que tienen lugar y las estructuras transitorias permitidas por estos movimientos.

Los grupos acilo del interior de la bicapa están ordenados en grados diferentes

Aunque la estructura de la bicapa lipídica es estable, las moléculas individuales de fosfolípidos tienen una gran libertad de movimiento **(Fig. 11-14)**, en función de la temperatura y la composición lipídica. Por debajo de las temperaturas fisiológicas normales los lípidos de una bicapa forman un **estado líquido-ordenado (L_o)** semisólido en la que están constreñidos fuertemente todos los tipos de movimiento de la moléculas individuales de lípido; la bicapa es paracristalina (Fig. 11-14a). Por encima de las temperaturas fisiológicas las cadenas hidrocarbonadas individuales de los ácidos grasos están en movimiento constante que se produce por rotación alrededor de los enlaces carbono-carbono de las largas cadenas laterales acílicas y por la difusión lateral de moléculas lipídicas individuales en el plano de la bicapa. Este es el **estado líquido desordenado (L_d)** (Fig. 11-14b). En la transición del estado Lo al estado Ld, se mantienen la forma general y las dimensiones de la bicapa; lo que cambia es el grado de movimiento (lateral y rotacional) permitido a las molécvulas individuales de lípido. el interior de la bicapa es más fluido que sólido y la bicapa es como un mar de lípido en movimiento constante. A temperaturas intermedias (fisiológicas), los lípidos se encuentran en un **estado líquido ordenado;** hay menos moción térmica de las cadenas acilo de la

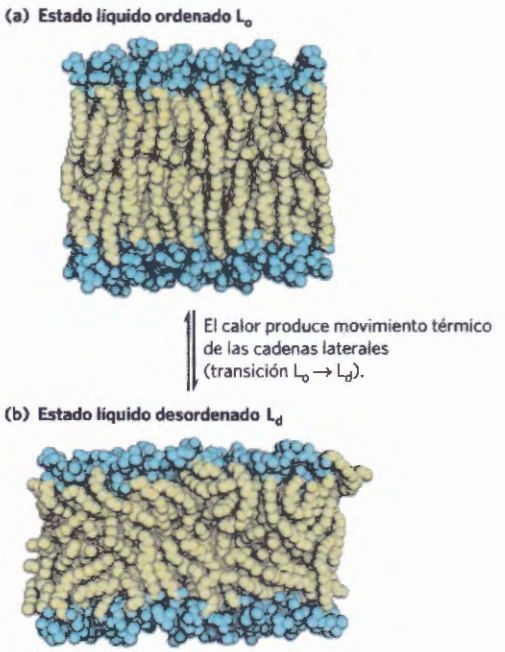


FIGURA 11-14 Dos estados extremos de los lípidos de la bicapa. (a) En el estado líquido ordenado (L_o), los grupos de cabeza polares están ordenados uniformemente en la superficie y las cadenas acilo están casi quietas y empaquetadas con una geometría regular; (b) en el estado líquido desordenado (L_d), o estado fluido, las cadenas acilo experimentan mucha moción térmica y no tienen una organización regular. El estado de los lípidos de membrana en las membranas biológicas se mantiene intermedio entre estos dos extremos. [Fuente: H. Heller et al., *J. Phys. Chem.* 97:8343, 1993.]

bicapa lipídica, pero aún tiene lugar el movimiento lateral en el plano de la bicapa. Estas diferencias en el estado de la bicapa se observan fácilmente en los liposomas compuestos por un único lípido pero las membranas biológicas contienen muchos lípidos con una gran variedad de cadenas acilo grasas por lo que no muestran cambios de fase abruptos con la temperatura.

A temperaturas fisiológicas (entre unos 20 y 40 °C para un mamífero) los ácidos grasos saturados de cadena larga (tales como 16:0 y 18:0) se tienden a empaquetarse en una fase de gel Lo, pero los giros de los ácidos grasos insaturados (véase la Fig. 10-1) interfieren con este empaquetamiento favoreciendo el estado Ld. Los grupos acilo graso de cadena más corta son más móviles que los grupos acilo graso de cadena más larga y, de este modo, favorecen el estado Ld. El contenido en esteroles de una membrana (que varía muchísimo con el organismo y el orgánulo; Tabla 11-1) es otro determinante importante del estado lipídico. Los esteroles (tales como el colesterol) tienen efectos paradójicos sobre la fluidez de la bicapa; interaccionan con fosfolípidos que contienen cadenas de acilo graso insaturados compactándolos y limitando su movimiento en la bicapa. Por contra, su asociación con esfingolípidos y fosfolípidos con cadenas de acilo graso largas y saturadas tiende más bien a formar una bicapa fluida que, sin colesterol, adoptaría el estado Lo. En las membranas biológicas compuestas por diversos fosfolípidos y esfingolípidos, el colesterol tiende a asociarse con los esfingolípidos formando regiones en estado Lo rodeadas de regiones con poco colesterol en estado Ld (véase la discusión de las balsas –"rafts"- de membrana más adelante).

Las células regulan su composición lipídica de forma que se consigue una fluidez de membrana constante en diversas condiciones de crecimiento. Por ejemplo, cuando se cultivan a baja temperatura las bacterias sintetizan más ácidos grasos insaturados y menos ácido saturados que cuando se cultivan a temperaturas elevadas (Tabla 11-2). Resultado de este ajuste en la composición lipídica, las membranas de las bacterias cultivadas a altas o bajas temperaturas tienen aproximadamente el mismo grado de fluidez. Probablemente esto es esencial para la función de muchas proteínas (enzimas, transportadores y receptores) que actúan dentro de la bicapa lipídica.

El movimiento de lípidos transbicapa requiere catálisis

A temperaturas fisiológicas una molécula de lípido difunde de una hoja (monocapa) de la bicapa a la otra **(Fig. 11-15a)** muy lentamente, si es que llega a hacerlo, aunque la difusión lateral *en el plano* de la bicapa es muy rápida (Fig. 11-15b). El movimiento transbicapa (o "flip-flop") requiere que un grupo de cabeza polar o cargado, abandone su entorno acuoso y se traslade al interior hidrofóbico de la bicapa, proceso que tiene una gran variación positiva de energía libre. Hay, sin embargo, situaciones en las que tal movimiento es esencial. Por ejemplo, en el RE, los glicerofosfolípidos de mem-

TABLA 11-2 Composición de ácidos grasos de las células de *E. coli* cultivadas a diferentes temperaturas

	Porcentaje total de ácidos grasos[a]			
	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C
Ácido mirístico (14:0)	4	4	4	8
Acido palmítico (16:0)	18	25	29	48
Ácido palmitoleico (16:1)	26	24	23	9
Ácido oleico (18:1)	38	34	30	12
Ácido hidroximirístico	13	10	10	8
Relación de insaturados respecto a saturados[b]	2,9	2,0	1,6	0,38

Fuente: Datos de Marr, A.G. & Ingraham, J.L.(1962) Effect of..... *J. Bacteriol.* 84, 1260.

[a]La composición exacta de ácidos grasos depende no sólo de la temperatura de crecimiento sino también de la etapa de crecimiento y de la composición del medio de cultivo.

[b]Calculada como porcentaje total de 16:1 más 18:1 dividido por el porcentaje total de 14:0 más 16:0. El ácido hidroximirístico se omitió en este cálculo.

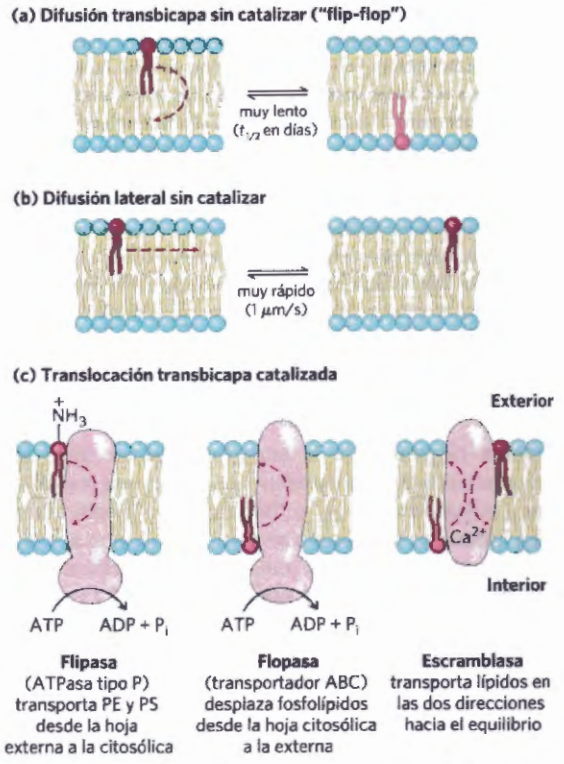


FIGURA 11-15 Movilidad de fosfolípidos individuales en una bicapa. **(a)** El movimiento sin catalizar desde una cara a la otra es muy lento, pero **(b)** la difusión lateral dentro de la hoja es muy rápido y no requiere catálisi. **(c)** Tres tipos de translocadores de fosfolípido de la membrana plasmática. PE es fosfatidiletanolamina; PS fosfatidilserina.

brana se sintetizan en la cara citosólica mientras que los esfingolípidos se sintetizan o modifican en la superficie de la luz. Para ir de su sitio de síntesis al punto final de deposición, estos lípidos han de experimentar difusión flip-flop (transbicapa).

Proteínas denominadas flipasas, flopasas y escramblasas (Fig. 11-15c) facilitan el movimiento transbicapa (translocación) de moléculas de lípido individuales, proporcionando una ruta que es energéticamente más favorable y mucho más rápida que el movimiento sin catalizar. La combinación de biosíntesis asimétrica de los lípidos de membrana, la difusión flip-flop sin catalizar muy lenta, y la presencia de translocadores lipídicos selectivos dependientes de energía, es responsable de la asimetría transbicapa en la composición lipídica discutida en la Sección 11-1. Aparte de contribuir a la asimetría en la composición, el transporte de lípidos dependiente de energía a una de las hojas de la bicapa puede, al crear una gran superficie en un lado de la bicapa, ser importante en la generación de la curvatura de la membrana esencial en la gemación de vesículas.

Las **flipasas** catalizan la translocación de los *amino*fosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina desde la hoja extracelular a la citosólica de la membrana plasmática, contribuyendo a la distribución asimétrica de los fosfolípidos: fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina principalmente en la hoja citosólica mientras que los esfingolípidos y la fosfatidilcolina en la hoja externa. El mantener la fosfatidilserina fuera de la hoja extracelular es importante: su exposición sobre la superficie exterior desencadena la apoptosis (muerte celular programada; véase el Capítulo 12) y su ingestión por los macrófagos portadores de receptores de fosfatidilserina. Las flipasas también actúan en el RE en donde transportan fosfolípidos recién sintetizados desde su sitio de síntesis en la hoja citosólica a la hoja de la luz. Las flipasas consumen alrededor de un ATP por molécula de fosfolípido translocado y están estructural y funcionalmente relacionadas con las ATPasas tipo P (transportadores activos) descritas en la p. 413.

Se concocen otros dos tipos de actividades translocadoras de lípidos si bien no están tan bien caracterizadas. Las **flopasas** transportan fosfolípidos de la membrana plasmática desde la hoja citosólica a la hoja extracelular y, al igual que las flipasas, son dependientes de ATP. Las flopasas son miembros de la familia de transportadores ABC descritos en la página 413, todos los cuales transportan activamente sustratos hidrofóbicos hacia fuera a través de la membrana plasmática. Las **escramblasas**, son proteínas que desplazan cualquier fosfolípido de membrana a través de la bicapa a favor de su gradiente de concentración (desde la hoja con una concentración mayor a la hoja con menor concentración); su actividad no depende del ATP. La actividad escramblasa lleva a la composición estadística controlada de grupos de cabeza en las dos caras de la bicapa. La actividad aumenta abruptamente con un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, la cual puede ser resultado de activación celular, lesión celular o apoptosis; tal como se ha indicado anteriormente, la exposición de fosfatidilserina en la superficie exterior marca una célula para la apoptosis e ingestión por macrófagos. La rodopsina, proteína que detecta la luz en el ojo de los vertebrados, tiene una segunda actividad: es una escramblasa que facilita la rápida distribución al azar, superior a 10.000 fosfolípidos por proteína y segundo. Finalmente, se cree que un grupo de proteínas que actúan principalmente transportando lípidos de fosfatidilinositol a través de las bicapas lipídicas, las proteínas transferidoras de fosfatidilinositol, tienen papeles importantes en la señalización de lípidos y en el tráfico a través de la membrana.

Lípidos y proteínas difunden lateralmente en la bicapa

Las moléculas de lípido individuales pueden trasladarse lateralmente en el plano de la membrana intercambiando su sitio con moléculas lipídicas vecinas, es decir experimentan movimiento browniano dentro de la bicapa (Fig. 11-15b) que puede ser muy rápido. Una molécula en la cara externa de la membrana plasmática de eritrocito, por ejemplo, puede difundir lateralmente con tal rapidez que puede dar la vuelta completa al eritrocito en segundos. Esta rápida difusión lateral dentro del plano de la bicapa, tiende a hacer aleatoria la posición de las moléculas individuales en unos pocos segundos.

Se puede demostrar experimentalmente la difusión lateral mediante la unión de sondas fluorescentes a los grupos de cabeza de lípidos y utilizando la microscopia de fluorescencia para seguir las sondas en función del tiempo **(Fig. 11-16)**. En una de las técnicas se decolora una pequeña región (5 μm^2) de una superficie celular con lípidos marcados con fluorescencia por medio de radiación láser intensa de modo que la pequeña exten-

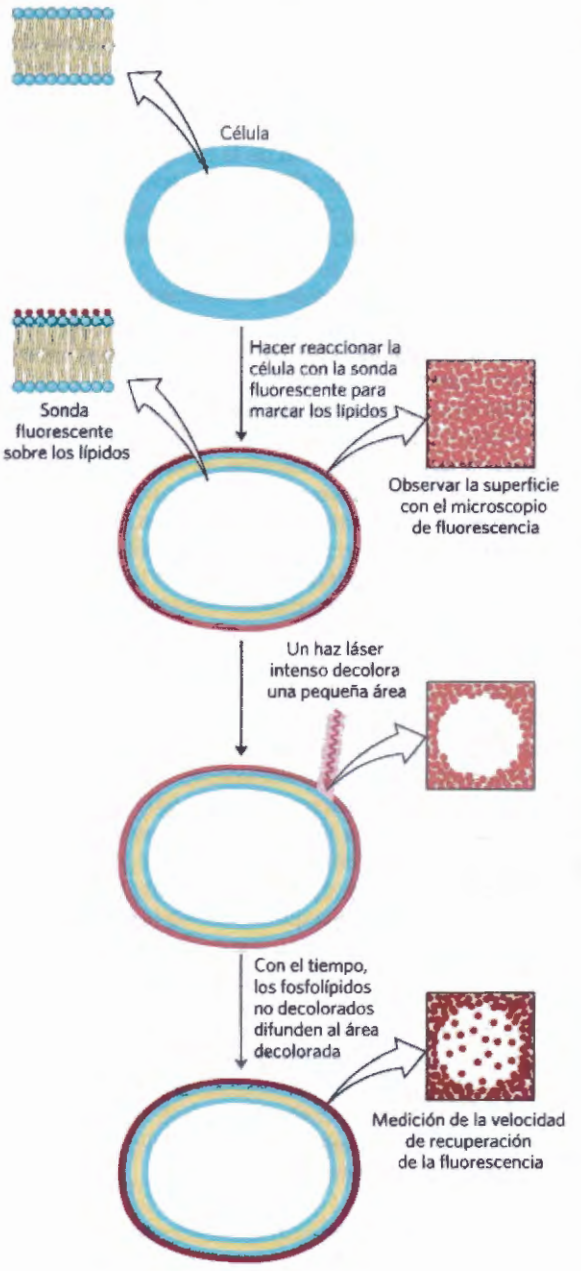


FIGURA 11-16 Medición de las velocidades de difusión lateral de lípidos mediante recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración (FRAP). Los lípidos de la hoja exterior de la membrana plasmática se marcan mediante una reacción con una sonda fluorescente impermeable a la membrana (rojo), de manera que la superficie queda marcada de manera uniforme cuando se observa al microscopio de fluorescencia. Se decolora una pequeña área por irradiación con un haz láser intenso con lo que tal área deja de ser fluorescente. Con el paso del tiempo, moléculas de lípido marcadas difunden hacia la región decolorada con lo que vuelve a ser fluorescente. A partir de la recuperación de la fluorescencia en función del tiempo puede determinarse el coeficiente de difusión del lípido marcado. Las velocidades de difusión son normalmente elevadas; un lípido que se desplace a esta velocidad podría circunnavegar *E. coli* en un segundo. (El método FRAP también se puede utilizar para medir la difusión lateral de proteínas de membrana).

sión irradiada ya no fluoresce cuando se observa a la luz mucho más tenue del microscopio de fluorescencia (no decolorante). Sin embargo, en cuestión de milisegundos la región recupera su fluorescencia ya que moléculas de lípido no decoloradas difunden a la parte decolorada a la vez que las moléculas de lípido decoloradas difunden fuera de la misma. La velocidad de recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración o **FRAP** (*f*luorescent *r*ecovery *a*fter *p*hotobleaching), es una medida de la velocidad de difusión lateral de los lípidos. Utilizando la técnica FRAP se ha demostrado que algunos lípidos de membrana difunden lateralmente a una velocidad de hasta 1 μm/s.

Otra técnica, el rastreo de una sola partícula, permite seguir el movimiento de una *única* molécula de lípido en la membrana plasmática en una escala de tiempo mucho menor. Los resultados de estos estudios confirman la rápida difusión lateral dentro de regiones concretas pequeñas de la superficie celular pero aquel movimiento de una de estas regiones a una región vecina ("difusión a saltos" o "hop diffusion") está inhibido; los lípidos de membrana se comportan como si estuviesen cercados por vallas que sólo pueden cruzar ocasionalmente por difusión a saltos **(Fig. 11-17)**.

Muchas proteínas de membrana se mueven como si flotasen en un mar de lípidos. Al igual que los lípidos de membrana estas proteínas tienen libertad para difundir lateralmente en el plano de la bicapa y están en movimiento constante, tal como se demuestra mediante la técnica FRAP con proteínas de superficie con marcadores fluorescentes. Algunas proteínas de membrana se asocian formando grandes agregados ("parches") en la superficie de una célula u orgánulo, en la que las moléculas de proteína individuales no se mueven unas respecto a las otras; por ejemplo, los receptores de acetilcolina forman densos parches casi cristalinos sobre las

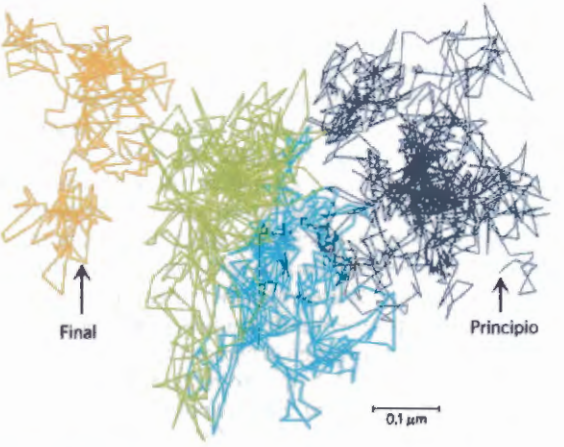


FIGURA 11-17 Difusión a saltos de moléculas de lípido individuales. El movimiento de una única molécula de lípido fluorescente en una superficie celular se registra en vídeo por microscopia de fluorescencia, con una resolución en el tiempo de 25 μs (equivalente a 40.000 marcos/s). El trazo aquí mostrado representa una molécula seguida durante 56 ms (2.250 marcos); el trazo empieza en el área púrpura y continúa a través de las áreas azul, verde y naranja. El patrón de movimiento indica una difusión rápida dentro de una región confinada (alrededor de 250 nm de diámetro, señalada por un solo color), con saltos ocasionales a una región adyacente. Este descubrimiento sugiere que los lípidos se encuentran encerrados por vallas moleculares que pueden saltar de vez en cuando. [Fuente: Cortesía de Takahiro Fujiwara, Ken Ritchie, Hideji Murakoshi, Ken Jacobson y Akihiro Kusumi.]

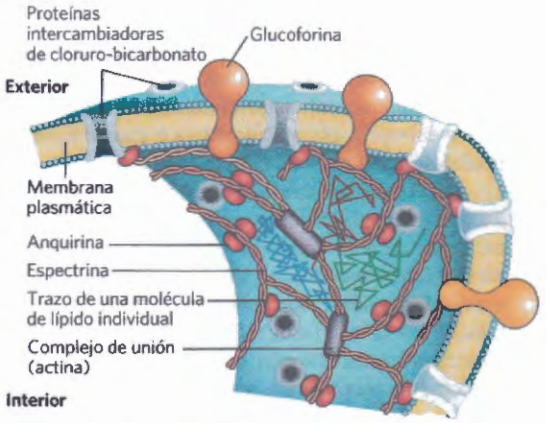


FIGURA 11-18 Movilidad restringida del intercambiador cloruro-bicarbonato del eritrocito y de la glucoforina. Las proteínas abarcan la membrana y se ligan a la proteína citoesquelética espectrina mediante otra proteína, la anquirina, limitando sus movilidades laterales. La anquirina está anclada a la membrana por una cadena lateral de palmitilo unida covalentemente (véase la Fig. 11-13). La espectrina, una proteína larga y filamentosa, se entrecruza en complejos de unión que contienen actina. Una red de moléculas de espectrina entrecruzadas unidas a la cara citoplasmática de la membrana plasmática estabiliza la membrana contra deformaciones. Esta rec de proteínas de membrana ancladas puede ser el "corral" sugerido por el experimento de la Figura 11-17; los rastros de lípido aquí mostrados están confinados a diferentes regiones definidas por las proteínas de membrana ligadas. De vez en cuando una molécuyla de lípido (trazo verde) salta de un corral a otro (trazo azul) y después aun a otro (trazo rojo).

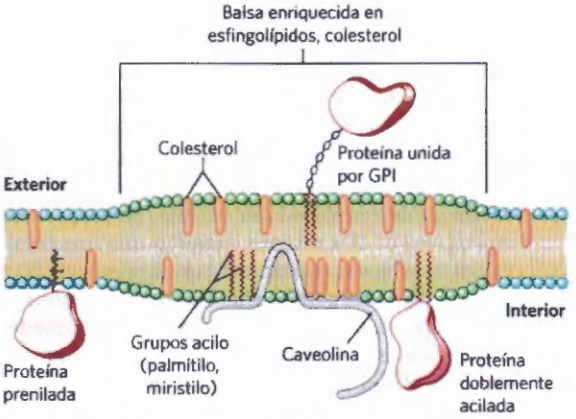


FIGURA 11-19 Microdominios (balsas) en la membrana. Asociaciones estables de esfingolípidos y colesterol en la hoja externa producen un microdominio, ligeramente más grueso que otras regiones de la membrana, que está enriquecido con tipos específicos de proteínas de membrana. Las proteínas ancladas por GPI se encuentran predominantemente en la hoja externa de estas balsas mientras que proteínas con uno o varios grupos acilo de cadena larga unidos covalentemente son frecuentes en la hoja interna. La caveolina se encuentra de modo preferente en balsas curvadas hacia el interior denominadas caveolas especialmente enriquecidas en proteínas denominadas caveolinas (véase la Fig. 11-20). Las proteínas con grupos prenilo unidos (tales como Ras; véase el Recuadro 12-1) tienden a ser excluidas de las balsas.

membranas plasmáticas neuronales en las sinapsis. Otras proteínas de membrana están ancladas a estructuras internas que evitan su libre difusión. En la membrana del eritrocito, tanto la glucoforina como el intercambiador de bicarbonato-cloruro (véase la p. 410) están ligados a la espectrina, una proteína filamentosa del citoesqueleto, **(Fig. 11-18)**. Una explicación posible del patrón de difusión lateral de las moléculas de lípido mostrado en la Figura 11-17 es que las proteínas de membrana inmovilizadas por su asociación con la espectrina forman las "vallas" que definen las regiones de movimiento lipídico relativamente no restringido.

Los esfingolípidos y el colesterol se agrupan conjuntamente en balsas de membrana

Hemos visto que la difusión de los lípidos de membrana de una cara de la bicapa a la otra es muy lenta a menos que esté catalizada y que las diferentes especies de lípido de la membrana plasmática están distribuidas de manera asimétrica en las dos hojas de la bicapa (Fig. 11-5). Incluso dentro de una misma hoja, la distribución de lípidos no es uniforme. Los glucoesfingolípidos (cerebrósidos y gangliósidos), que contienen normalmente ácidos grasos saturados de cadena larga, forman agrupaciones transitorias en la hoja externa que excluye prácticamente los glicerofosfolípidos, los cuales contienen habitualmente un grupo acilo graso insaturado y un grupo acilo graso saturado más corto. Los grupos acilo saturados largos de los esfingolípidos pueden formar asociaciones más compactas y estables con el largo sistema anular del colesterol que las cadenas más cortas y, a menudo insaturadas, de los fosfolípidos. Los **microdominios** de la membrana plasmática hacen que la bicapa sea ligeramente más gruesa y más ordenada (menos fluida) que regiones vecinas ricas en fosfolípidos y que sean más difíciles de disolver con detergentes no iónicos; se comportan como **balsas** (*rafts*) de esfingolípido de estructura líquida ordenada a la deriva en un océano de fosfolípidos líquidos desordenados **(Fig. 11-19)**. Proteínas con secciones helicoidales hidrofóbicas relativamente cortas (19 a 20 residuos) no pueden abarcar la bicapa más gruesa de las balsas por lo que tienden a ser excluidas. Proteínas con hélices hidrofóbicas más largas (24 a 25 residuos) se segregan a las regiones bicapa más gruesas de las balsas, donde se estabiliza la longitud total de la hélice gracias al efecto hidrofóbico.

Las balsas de lípidos contienen una cantidad elevada de dos clases de proteínas integrales de membrana con dos tipos específicos de lípidos unidos covalentemente. Las proteínas integrales de una clase tienen dos ácidos grasos saturados de cadena larga (dos grupos palmitilo o un grupo palmitilo y uno miristilo)unidos de forma covalente mediante residuos Cys . Las de la segunda clase, las proteínas ancladas por GPI, tienen un glucosilfosfatidilinositol en su residuo carboxilo-terminal (Fig. 11-13). Probablemente, estas anclas lipídicas, lo mismo que las cadenas acílicas largas saturadas de los esfingolípidos, forman asociaciones más estables con el colesterol y los grupos acílicos largos de las balsas que con los fosfolípidos que las rodean. (Es de notar que otras proteínas unidas a lípidos, las que contienen grupos isoprenilo tales como el farnesilo unidos de forma covalente, *no* se asocian preferentemente con la hoja externa de las balsas de esfingolípido/colesterol; véase la Fig. 11-19). Los dominios "balsa" y "mar" de la membrana plasmática no están separados de manera rígida; las proteínas de membrana pueden desplazarse hacia dentro y hacia fuera de las balsas de lípido en una escala de tiempo de segundos. Pero en la escala de tiempo más corta (microsegundos)

más adecuada para muchos procesos bioquímicos en los que intervienen membranas, muchas de estas proteínas residen principalmente en una balsa.

Se puede calcular la fracción de superficie celular ocupada por balsas a partir de la fracción de membrana plasmática que resiste la solubilización por detergentes que, en algunos casos, puede llegar a ser del 50%: las balsas cubren la mitad del océano. Medidas indirectas en cultivos de fibroblastos sugieren que una balsa individual tiene aproximadamente un diámetro de 50 nm, lo que corresponde a un parche con unos cuantos miles de esfingolípidos y quizá 10 a 50 proteínas de membrana. Debido a que la mayoría de células expresan más de 50 clases diferentes de proteínas de la membrana plasmática, es probable que una sola balsa contenga sólo un subconjunto de proteínas de membrana y que esta segregación de proteínas de membrana sea funcionalmente significativa. Para un proceso en el que interviene la interacción de dos proteínas de membrana, su presencia en una misma balsa aumentaría grandemente la probabilidad de su colisión. Ciertos receptores de membrana y proteínas de señalización, por ejemplo, parecen estar segregadas conjuntamente en balsas de membrana. Se han hecho experimentos que demuestran que se puede interferir en la señalización a través de estas proteínas mediante manipulaciones que eliminan el colesterol de la membrana plasmática y destruyen las balsas de lípidos.

Una **caveolina** es una proteína integral de membrana con dos dominios globulares conectados por un dominio hidrofóbico en forma de horquilla que une la proteína a la hoja citoplasmática de la membrana plasmática. El anclaje a la membrana se refuerza con tres grupos palmitilo unidos al dominio globular carboxi-terminal. Las caveolinas forman dímeros y se asocia con regiones de la membrana ricas en colesterol. La presencia de dímeros de caveolina fuerza a la bicapa lipídica asociada a curvarse hacia dentro, formando **caveolas** ("pequeñas cuevas") en la superficie de la célula **(Fig. 11-20)**. Las caveolas son balsas especiales: en ellas intervienen *ambas* hojas de la bicapa (la hoja citoplasmática, de la que se proyectan los dominios globulares de la caveolina y la hoja extracelular, una balsa típica de esfingolípidos/colesterol con proteínas asociadas ancladas por GPI). Las caveolas intervienen en diversas funciones celulares, entre las que se incluyen el tráfico a través de membranas dentro de las células y la transducción de señales externas en respuestas celulares. Los receptores de la insulina y de otros factores de crecimiento, así como ciertas proteínas de unión a GTP y proteína quinasas asociadas con la señalización transmembrana, parecen estar localizadas en balsas y, quizá, en caveolas. En el Capítulo 12 se tratan algunos papeles posibles de las balsas en la señalización.

Las caveolas también pueden proporcionar una forma de expandir la superficie celular. La bicapa lipídica no es, en sí, elástica, pero si caveolas existentes pierden su caveolina asociada como resultado de una señal reguladora, las caveolas aplanan la membrana plasmática (Fig. 11-20c). El efecto es que se añade área superficial, permitiendo que la célula se expanda sin explotar en respuesta a estrés osmótico o de otro tipo.

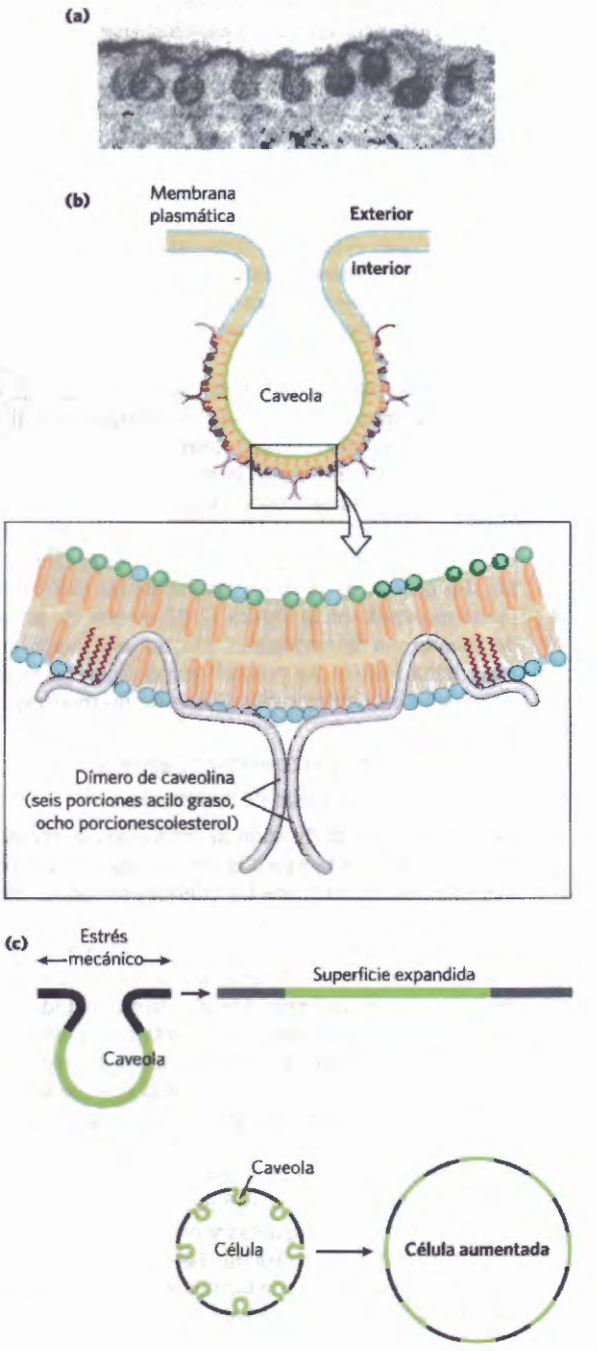


FIGURA 11-20 Una caveolina fuerza la curvatura hacia adentro de las membranas. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, tal como se ven en **(a)** una micrografía electrónica de una superficie de adipocito marcada con un marcador denso en electrones. **(b)** Esquema que muestra la localización y papel de la caveolina en la curvatura hacia adentro de la membrana. Cada monómero de caveolina tiene un dominio central hidrofóbico y tres grupos acilo de cadena larga (rojo) que mantienen la molécula en el interior de la membrana plasmática. Cuando se concentran en una pequeña región (una balsa) varios dímeros de caveolina, fuerzan una curvatura de la bicapa lipídica, formando una caveola. Las moléculas de colesterol de la bicapa se muestran en naranja. **(c)** El aplanamiento de las caveolas permite que se expanda la membrana plasmática en respuesta a diversos estreses. [Fuente: (a) Cortesía de R. G. Parton. Reproducido con permiso de Macmillan Publishers, Ltd. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:185-194, Fig. 1a. ©2007.]

La curvatura y la fusión de membranas son cruciales en muchos procesos biológicos

Las caveolinas no son únicas en su capacidad de inducir curvatura en las membranas. Los cambios de curvatura son cruciales en una de las propiedades más notables de las membranas biológicas: su capacidad para fusionarse con otras membranas sin perder su continuidad. Aunque las membranas son estables ello no quiere decir que sean estáticas. Dentro del sistema endomembranoso eucariótico (que incluye la membrana nuclear, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y varias vesículas pequeñas) hay una reorganización constante de los compartimientos membranosos. Hay pequeñas vesículas que brotan del RE para llevar lípidos y proteínas recién sintetizados a otros orgánulos y a la membrana plasmática. En la exocitosis, endocitosis, división celular, fusión de las células del huevo y esperma y la entrada de un virus con envuelta membranosa dentro de la célula huésped tiene lugar en todos ellos la reorganización de la membrana que requiere la fusión de dos segmentos membranosos sin pérdida de continuidad **(Fig. 11-21)**. La mayoría de estos procesos empiezan con un incremento local de la curvatura de la membrana. Una proteína que ya es intrínsecamente curvada puede forzar la curvatura de una bicapa al unirse a ella **(Figura 11-22)**; la energía de fijación proporciona la fuerza motriz para incrementar la curvatura de la membrana. Alternativamente, muchas subunidades de una proteína de armazón puede unirse en complejos supramoleculares curvados y estabilizar curvas que se forman espontáneamente en una bicapa. Por ejemplo, una superfamilia de proteínas que contienen **dominios BAR** (así nombrados por los tres primeros miembros de la familia que se identificaron: *B*1N1, *a*nfifisina y *R*VS167) pueden unirse en un armazón en forma de luna creciente que se une a la superficie de la membrana lo que fuerza o favorece la curvatura de la misma. Los dominios BAR consisten en superenrollamientos que forman dímeros curvados largos y finos con una superficie cóncava cargada positivamente que tiende a establecer interacciones iónicas con los grupos de cabeza cargados negativamente de los lípidos de membrana PIP2 y PIP3. La formación enzimática de estos lípidos de inositol puede marcar un área de la membrana plasmática para la creación de una curvatura hacia dentro mediante una proteína BAR (Fig. 11-22). Algunas de estas proteínas BAR también tienen una región helicoidal que se inserta como una cuña en una cara de la bicapa expandiendo su área en relación con la otra cara con lo que fuerza su curvatura.

La fusión específica de dos membranas requiere que (1) se reconozcan entre sí; (2) sus superficies estén muy cerca, lo que requiere la eliminación de las moléculas de agua normalmente asociadas con los grupos de cabeza polares de los lípidos; (3) sus estructuras en bicapa se rompan localmente dando lugar a la fusión de la hoja externa de cada membrana (hemifusión); y

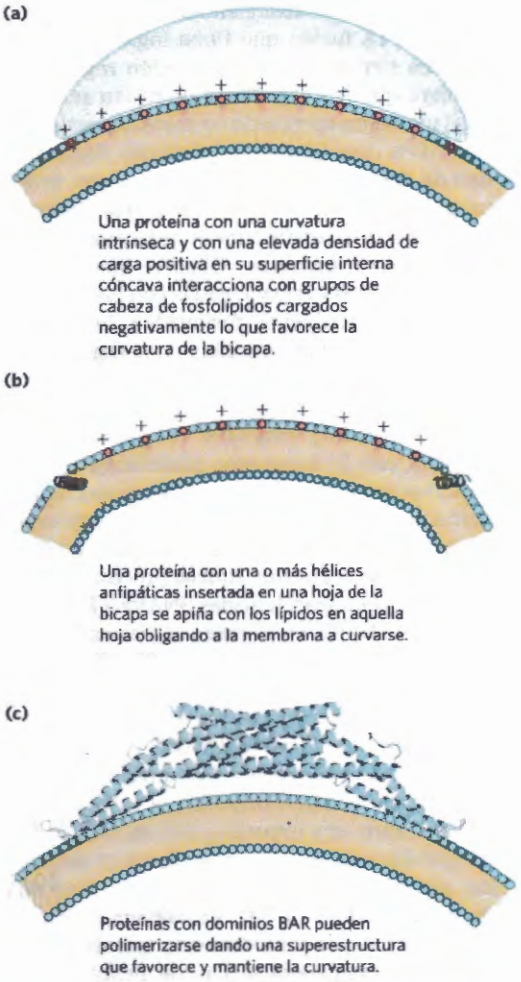


FIGURA 11-22 Tres modelos para la curvatura de las membranas inducida por proteínas. [Fuentes: (a, b) Información de B. Qualman et al., *EMBO J.* 30:3501, 2011, Fig. 1. (c) Información de B. J. Peter et al., *Science* 303:495, 2004, Fig. 1a.]

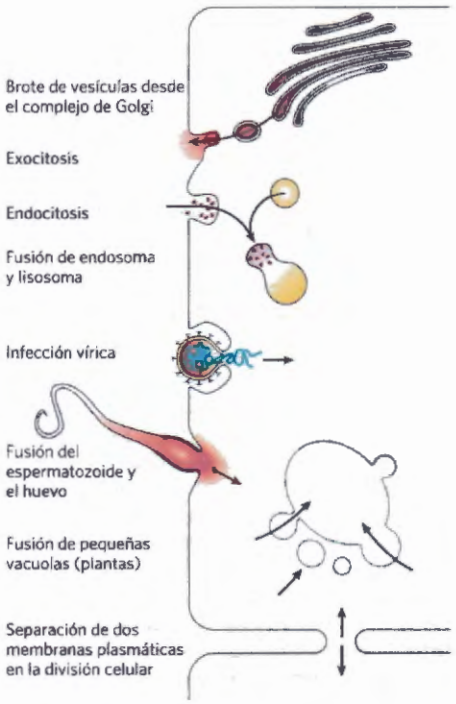


FIGURA 11-21 Fusión de membranas. La fusión de dos membranas es fundamental en multitud de procesos celulares en los que intervienen tanto orgánulos como la membrana plasmática.

(4) sus bicapas se fusionen formando una bicapa única continua. La fusión que tiene lugar en la endocitosis mediada por receptor, o secreción regulada, también requiere que (5) el proceso de fusión se desencadene en el momento apropiado o como respuesta a una señal específica. Las proteínas integrales llamadas **proteínas de fusión** favorecen estos procesos, promoviendo un reconocimiento específico y una distorsión local transitoria de la estructura de la bicapa que favorece la fusión de la membrana. (Observe que estas proteínas de fusión no están relacionadas con los productos codificados por dos genes fusionados, también llamados proteínas de fusión, descritas en el Capítulo 9).

Un ejemplo bien estudiado de fusión de membrana tiene lugar en las sinapsis cuando vesículas intracelulares (neuronales) cargadas con neurotransmisor se fusionan con la membrana plasmática. Las células de levadura proporcionan otro sistema asequible desde el punto de vista experimental en el que hay vesículas que se fusionan con la membrana plasmática, liberando sus productos de secreción. Ambos procesos requieren una familia de proteínas llamadas SNARE **(Fig. 11-23)**. Las proteínas SNARE en la cara citoplasmática de las vesículas intracelulares se llaman **v-SNARE** (*v* de vesícula); las que están en las membranas diana con las que se fusionan las vesículas (la membrana plasmática durante la exocitosis) se llaman **t-SNARE** (*t* de target = diana). La proteína NSF regula las interacciones entre las SNARE. Durante la fusión una v-SNARE y una t-SNARE se unen entre sí y experimentan un cambio estructural que produce un haz de varillas largas y delgadas formadas por hélices de ambas SNARE así como dos hélices de SNAP25 (Fig. 11-23). Inicialmente las dos SNARE interaccionan por sus extremos y a continuación cierran como una cremallera el haz de hélices. Este cambio estructural pone en contacto las dos membranas y se inicia la fusión de sus bicapas lipídicas. Una denominación alternativa de los tipos de SNARE se basa en características estructurales de las proteínas: R-SNARE tienen un residuo Arg crítico para su función y las Q-SNARE un residuo Gln crítico. Normalmente, las R-SNARE actúan como las v-SNARE mientras que las Q-SNARE actúan como las t-SNARE. James E. Rothman, Randy W. Schekman y Thomas C. Südhof compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2013 por su descubrimiento de la base molecular del tráfico de membranas y de la fusión.



Thomas C. Südhof, Randy W. Schekman y James E. Rothman [Fuente: Alban Wyters/Sipa USA/AP Images.]

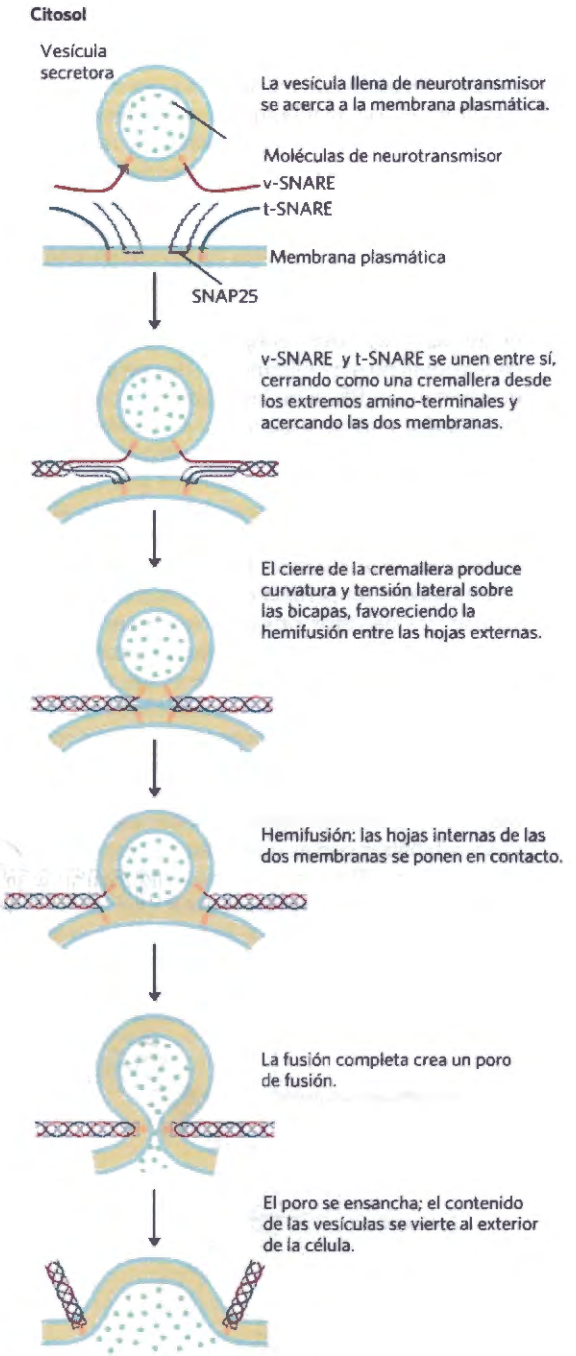


FIGURA 11-23 Fusión de membrana durante la liberación de un neurotransmisor en una sinapsis. La membrana de la vesícula secretora contiene la v-SNARE sinaptobrevina (rojo). La membrana diana (plasmática) contiene las t-SNARE sintaxina (azul) y SNAP25 (violeta). Cuando un aumento local de $[Ca^{2+}]$ señala la liberación del neurotransmisor, v-SNARE, SNAP25 y t-SNARE interaccionan formando un haz enrollado de cuatro hélices α, tirando conjuntamente de las dos membranas y rompiendo localmente la bicapa lo que lleva primero a la hemifusión, unión de las hojas internas de las dos membranas, para completar después la fusión de la membrana y la liberación de neurotransmisor. NSF (factor de fusión sensible a la *N*-etilmalimida) actúa en la desagregación del complejo SNARE cuando la fusión ya está completada. [Fuente: Información de Y. A. Chen y R. H. Scheller, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:98, 2001.]

El complejo de las SNARE y SNAP25 es la diana de varias toxinas potentes. La toxina de *Clostridium botulinum*, es una proteasa bacteriana que corta enlaces específicos de estas proteínas, impidiendo la neurotransmisión y causando parálisis y. Debido a su elevadísima especificidad por estas proteínas, se ha utilizado la toxina botulínica purificada como una potente herramienta para analizar el mecanismo de la liberación de neurotransmisores in vivo e in vitro. Utilizada en pequeñas cantidades, la toxina botulínica (Botox) se utiliza en medicina para tratar enfermedades de los músculos del ojo y del cuello, así como en cosmética para eliminar arrugas de la piel. La toxina tetánica, producida por la bacteria *Clostridium tetani*, también es una proteasa con alta especificidad por las proteínas SNARE. Produce dolorosos espasmos musculares y rigidez de los músculos voluntarios, de ahí el síntoma característico del "trismo" o "mandíbula trabada". ■

Ciertas proteínas integrales de la membrana plasmática favorecen la adhesión superficial, la señalización y otros procesos celulares

Varias familias de proteínas integrales de la membrana plasmática, proporcionan puntos específicos de anclaje entre células, o entre una célula y proteínas de la matriz extracelular. Las **integrinas** son proteínas de adhesión superficial que intervienen en la interacción de una célula con la matriz extracelular y con otras células, entre las que se incluyen algunos patógenos. Las integrinas también son portadoras de señales en ambas direcciones a través de la membrana plasmática, integrando información acerca del entorno tanto extra como intracelular. Todas las integrinas son proteínas heterodiméricas con dos subunidades diferentes, (α y β) cada una de ellas anclada a la membrana plasmática por una simple hélice transmembrana. Los dominios extracelulares grandes de las subunidades α y β se combinan para formar un sitio específico de unión para proteínas extracelulares tales como el colágeno y la fibronectina, que contienen un determinante común de la unión de las integrinas, la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD).

Otras proteínas de la membrana plasmática que también intervienen en la adhesión superficial son las **caderinas**, que experimentan interacciones homofílicas ("con la misma clase") con caderinas idénticas en células adyacentes. Las **selectinas** tienen dominios extracelulares que, en presencia de Ca^{2+}, unen polisacáridos específicos de la superficie de una célula adyacente. Las selectinas están presentes principalmente en los diversos tipos de células sanguíneas y en las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos (véase la Fig. 7-32). Son una parte esencial del proceso de coagulación de la sangre.

Las proteínas integrales de membrana intervienen en muchos otros procesos celulares. Actúan como transportadores y canales iónicos (como se discutirá en la Sección 11.3) y como receptores de hormonas, neurotransmisores, y factores de crecimiento (Capítulo 12). Son esenciales en la fosforilación oxidativa, y fotofosforilación (Capítulo 19 y 20) y en el reconocimiento célula-célula y antígeno-célula del sistema inmunitario (Capítulo 5). Las proteínas integrales también son responsables principales en la fusión de membranas que acompaña la exocitosis, endocitosis y la entrada de muchos tipos de virus en las células huésped.

RESUMEN 11.2 Dinámica de membranas

- Los lípidos de una membrana biológica pueden existir en estado líquido ordenado o en estado líquido desordenado; en este último caso, el movimiento térmico de las cadenas acilo hace que el interior de la bicapa sea fluido. La fluidez se ve afectada por la temperatura, la composición de ácidos grasos y el contenido en esteroles.
- La difusión flip-flop de lípidos entre las hojas interna y externa de una membrana es muy lenta excepto cuando está catalizada específicamente por flipasas, flopasas o escramblasas.
- Los lípidos y proteínas pueden difundir lateralmente dentro del plano de la membrana, pero esta motilidad está limitada por interacciones de las proteínas de membrana con estructuras internas del citoesqueleto e interacciones de lípidos con balsas de lípido. Una clase de balsas de lípidos están enriquecidas en esfingolípidos y colesterol con un subconjunto de proteínas de membrana que están unidas a GPI o a varias porciones acilo graso de cadena larga.
- Las caveolinas son unas proteínas integrales de membrana que se asocian con la hoja interna de la membrana plasmática obligándola a curvarse hacia dentro para formar caveolas, que intervienen en el transporte a través de membranas, en la señalización y en la expansión de membranas plasmáticas.
- Proteínas específicas que contienen dominios BAR producen una curvatura local de la membrana e intervienen en la fusión de dos membranas, la cual acompaña a procesos tales como la endocitosis, la exocitosis y la invasión vírica. Debido a que los fosfolípidos de inositol PIP2 y PIP3 son reconocidos específicamente por proteínas BAR, su formación puede ser la señal para el inicio de los procesos intracelulares que requieren curvatura de la membrana.
- Las SNARE son proteínas de membrana que actúan en la fusión de vesículas con la membrana plasmática, en respuesta a una señal.
- Integrinas, caderinas y selectinas son proteínas transmembrana de la membrana plasmática que actúan para unir células entre sí y para transportar mensajes entre la matriz extracelular y el citoplasma.

11.3 Transporte de solutos a través de membranas

Todas las células vivas deben adquirir de su alrededor las materias primas para la biosíntesis y para la producción de energía y deben liberar a su entorno los productos de desecho del metabolismo: ambos procesos requieren que compuestos pequeños o iones inorgánicos crucen la membrana plasmática. Dentro de la célula eucariótica, diferentes compartimientos tienen diferentes concentraciones de iones y de intermediarios y productos metabólicos, y estos, también, han de trasladarse a través de las membranas intracelulares mediante procesos fuertemente regulados. Unos pocos compuestos apolares pueden disolverse en la bicapa lipídica y cruzar la membrana sin más ayuda, pero en el caso de compuestos polares o iones es esencial una proteína de membrana para el transporte transmembrana. Aproximadamente 2.000 genes del genoma humano codifican proteínas que funcionan transpor-

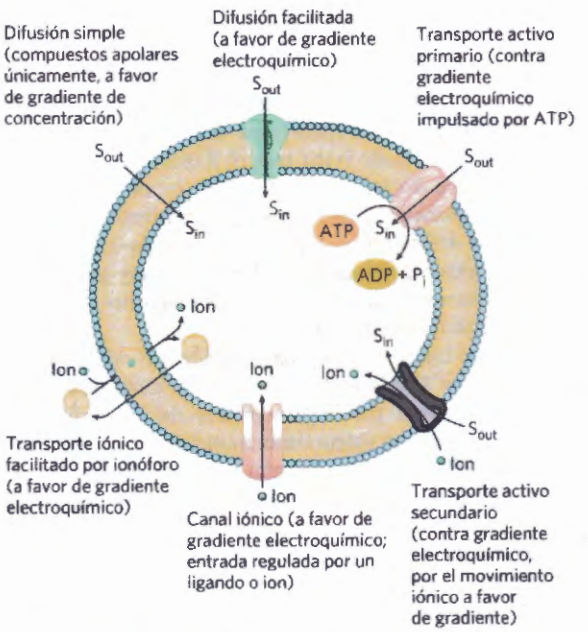


FIGURA 11-24 Resumen de los tipos de transporte. Algunos tipos (ionóforos, canales iónicos y transportadores pasivos) simplemente aceleran el movimiento transmembrana de solutos a favor de su gradiente electroquímico, mientras que otros (transportadores activos) pueden bombear solutos contra un gradiente, utilizando ATP o un gradiente de un segundo soluto para proporcionar la energía.

tando solutos a través de las membranas En algunos casos una proteína de membrana facilita la difusión de un soluto a favor de su gradiente de concentración, pero el transporte también puede tener lugar contra un gradiente de concentración, potencial eléctrico o ambos, y en estos casos, tal como veremos, el proceso requiere energía. Los iones también pueden difundir a través de las membranas vía canales iónicos formados por proteínas o pueden ser transportados por ionóforos que son moléculas pequeñas que enmascaran la carga de los iones y permiten que difundan a través de la bicapa lipídica. La **Figura 11-24** resume los diferentes tipos de mecanismos de transporte que se discuten en esta sección.

El transporte puede ser activo o pasivo

Cuando dos compartimientos acuosos que contienen diferentes concentraciones de un componente soluble o un ión están separados por una división permeable (membrana), el soluto se desplaza por **difusión simple** desde la región con una concentración más elevada, a través de la membrana, a la región de concentración más baja, hasta que los dos compartimientos tienen concentraciones iguales de soluto **(Fig. 11-25a)**. Cuando iones de cargas opuestas están separados por una membrana permeable, se crea un gradiente eléctrico transmembrana, un **potencial de membrana, V_m** (expresado en milivoltios). Este potencial de membrana produce una fuerza que se opone al movimiento de los iones que aumentan *V*m pero que impulsa el movimiento de los iones que reducen *V*m (Fig. 11-25b). Así, la dirección en la que un soluto cargado tiende a desplazarse espontáneamente a través de una membrana depende tanto del gradiente químico (la diferencia en concentración de soluto) como del gradiente eléctrico (*V*m) a través de la membrana. Juntos, estos dos factores se conocen como **gradiente electroquímico** o **potencial electroquímico**. Este comportamiento de los solutos está de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica: las moléculas tienden a adoptar espontáneamente la distribución de máxima aleatoriedad y mínima energía.

Las proteínas de membrana que actúan aumentando la velocidad de transporte de soluto a través de la membrana se denominan transportadores. Los transportadores son de dos tipos generales. Los **transportadores pasivos** facilitan, simplemente, el movimiento a favor de un gradiente de concentración, incrementando la velocidad de transporte. Este proceso se denomina **transporte pasivo** o **difusión facilitada**. Los **transportadores activos** (a veces denominados bombas) pueden transportar sustratos a través de la membrana contra un gradiente de concentración o potencial eléctrico, proceso denominado **transporte activo**. Los **transportadores activos primarios** utilizan energía proporcionada directamente por una reacción química; los **transportadores activos secundarios** acoplan el transporte cuesta arriba de un sustrato con el transporte cuesta abajo de otro.

Los transportadores y los canales iónicos comparten algunas propiedades estructurales pero tienen mecanismos diferentes

Para traspasar una bicapa lipídica, un soluto polar o cargado debe primero eliminar sus interacciones con las moléculas de agua en su capa de hidratación, a continuación difundir alrededor de unos 3 nm (30 Å) a través de una sustancia (lípido) en el que es poco soluble **(Fig. 11-26)**. La energía utilizada para romper la capa de hidratación y desplazar el compuesto polar desde el

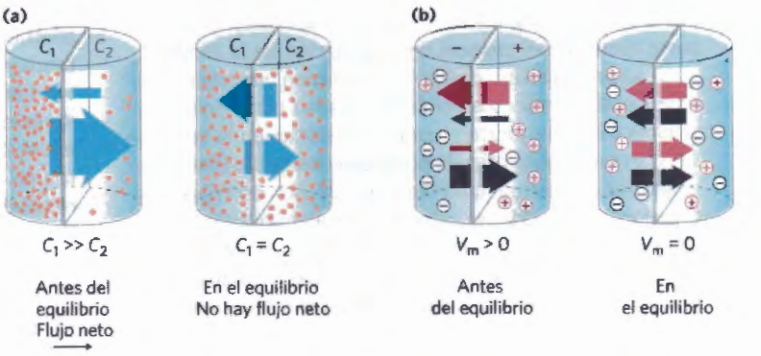


FIGURA 11-25 Desplazamiento de solutos a través de una membrana permeable. (a) El movimiento neto de solutos eléctricamente neutros es hacia el lado de menor concentración de soluto hasta que se alcanza el equilibrio. Las concentraciones de soluto a la izquierda y a la derecha de la membrana, tal como se muestran aquí, se designan C_1 y C_2. La velocidad de movimiento transmembrana del soluto (indicado por las flechas) es proporcional al gradiente de concentración. **(b)** El movimiento neto de solutos cargados eléctricamente viene dictado por una combinación del potencial eléctrico (V_m) y la razón de concentraciones químicas (C_2/C_1), a través de la membrana; el movimiento neto de iones continúa hasta que su potencial electroquímico llega a cero

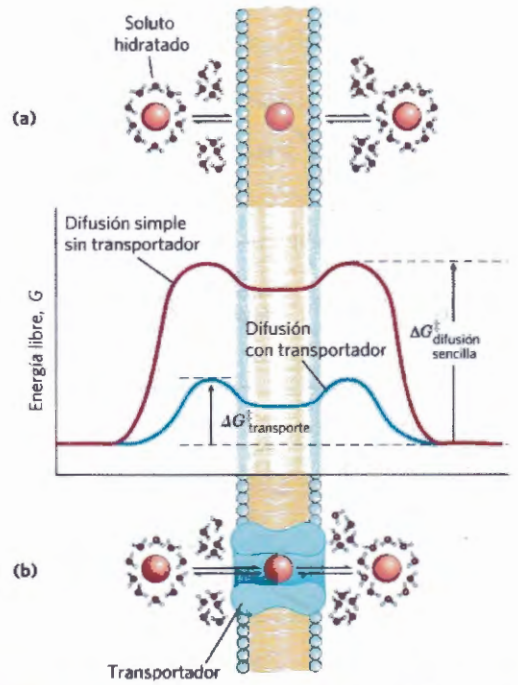


FIGURA 11-26 Cambios energéticos que acompañan el paso de un soluto hidrofílico a través de la bicapa lipídica de una membrana biológica. (a) En la difusión sencilla, la eliminación de la capa de hidratación es altamente endergónica, y la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) para la difusión a través de la bicapa es muy alta. **(b)** Una proteína transportadora reduce la $\Delta G^{\ddagger}$ para la difusión transmembrana del soluto. Lo hace estableciendo interacciones no covalentes con el soluto deshidratado para reemplazar los puentes de hidrógeno con el agua, y proporcionando una vía de paso hidrofílica transmembrana.

agua al lípido y, a continuación a través de la bicapa lipídica, se recupera cuando el compuesto abandona la membrana del otro lado y se rehidrata. Sin embargo, el estado intermedio del paso transmembrana es un estado de alta energía comparable al estado de transición de una reacción química catalizada por un enzima. En ambos casos, se debe superar una barrera de activación para alcanzar el estado intermedio (Fig. 11-26; compárese con la Fig. 6-3). La energía de activación ($\Delta G\ddagger$) para la translocación de un soluto polar a través de la bicapa es tan grande que las bicapas lipídicas puras son prácticamente impermeables a las especies polares o cargadas durante períodos de tiempo significativos para el crecimiento y división celulares.

Las proteínas de membrana disminuyen la energía de activación para el transporte de compuestos polares e iones proporcionando una ruta alternativa a través de la membrana para solutos específicos. La disminución de la energía de activación aumenta mucho la velocidad de transporte transmembrana (recuerde la Ecn. 6-6, p. 192). Los transportadores no son enzimas en el sentido usual; sus "sustratos" se transportan de un compartimiento a otro pero no son alterados químicamente. Sin embargo, al igual que los enzimas, los transportadores unen sus sustratos con especificidad estereoquímica a través de múltiples interacciones débiles, no covalentes. La variación de energía libre negativa asociada con estas interacciones débiles, $\Delta G_{\text{unión}}$ contrarresta la variación de energía libre positiva que acompaña la pérdida de agua de hidratación del sustrato, $\Delta G_{\text{deshidratación}}$, dando lugar a una disminución de la $\Delta G^{\ddagger}$ del paso transmembrana (Fig. 11-26). Las proteínas transportadoras abarcan la bicapa lipídica varias veces formando un canal transmembrana recubierto con cadenas laterales de aminoácidos hidrofílicos. El canal proporciona una ruta alternativa para que un sustrato específico se traslade a través de la bicapa lipídica sin tener que disolverse en la bicapa, lo que disminuye aun más la $\Delta G^{\ddagger}$ para la difusión transmembrana. El resultado es un incremento de varios órdenes de magnitud de la velocidad de paso del sustrato a través membrana.

Los **canales iónicos** aceleran el paso de iones inorgánicos a través de membranas mediante mecanismos diferentes a los de los transportadores. Los canales iónicos proporcionan un paso acuoso a través de la membrana por el que pueden difundir iones inorgánicos a velocidades muy elevadas. La mayoría de canales iónicos tienen una "compuerta" **(Fig. 11-27a)** regulada por una señal biológica. Cuando la compuerta está abierta, los iones se desplazan a través de la membrana, por el canal, en la dirección dictada por la carga del ión y el gradiente electroquímico. El desplazamiento se realiza a velocidades cercanas al límite de la difusión sin trabas (decenas de millones de iones por segundo y por canal; muy superior a las velocidades de los transportadores típicos). Los canales iónicos frecuentemente muestran alguna especificidad hacia un ión, pero no son satura-

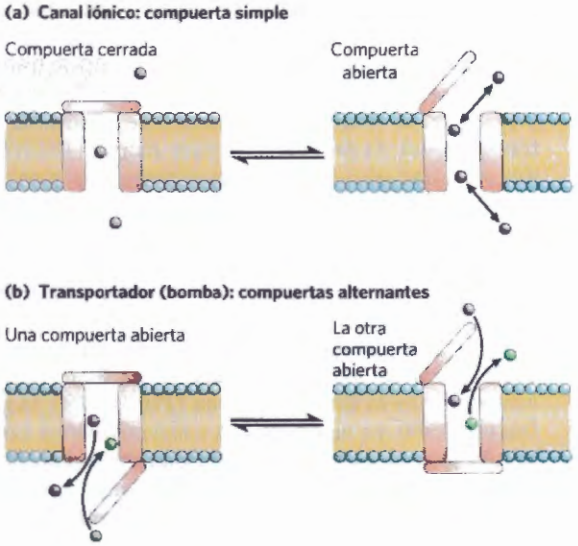


FIGURA 11-27 Diferencias entre canales y transportadores. (a) En un canal iónico, un poro transmembrana está abierto o cerrado, según la posición de la compuerta única. Cuando está abierto, los iones se desplazan a través del mismo a una velocidad limitada sólo pòr la velocidad máxima de difusión. **(b)** Los transportadores tienen dos compuertas que nunca están ambas abiertas al mismo tiempo. El movimiento de un sustrato (un ión o una molécula pequeña) a través de la membrana está, por tanto, limitado por el tiempo necesario para que una compuerta se abra y cierre (en un lado de la membrana) y por el que necesita la segunda compuerta para abrirse. Las velocidades de movimiento a través de los canales iónicos pueden ser varios órdenes de magnitud superiores a las velocidades a través de los transportadores. Los canales permiten simplemente que el ión fluya a favor del gradiente electroquímico mientras que los transportadores activos (bombas) pueden mover un sustrato contra un gradiente de concentración. [Fuente: Información de D. C. Gadsby, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10:344, 2009, Fig. 1.]

bles por su ión sustrato. El flujo a través de un canal se detiene cuando el mecanismo de compuerta está cerrado (asimismo por una señal biológica) o cuando ya no existe un gradiente electroquímico que proporciones la fuerza motriz para el desplazamiento. Ello contrasta con los transportadores que unen sus "sustratos" con elevada estereoespecificidad, catalizan el transporte a velocidades muy por debajo de los límites de la difusión libre y son saturables en el mismo sentido en que lo son los enzimas: existe una concentración de sustrato por encima de la cual posteriores incrementos no se traducen en una mayor velocidad de transporte. Los transportadores tienen una compuerta en los dos lados de la membrana y las dos compuertas no están nunca abiertas al mismo tiempo (Fig. 11-27b).

Tanto los transportadores como los canales iónicos constituyen grandes familias de proteínas, que se definen no solo por sus secuencias primarias sino por sus estructuras secundarias. A continuación describiremos algunos representantes bien estudiados de las principales familias de transportadores y canales. Volverá a encontrar también algunos de estos transportadores en el Capítulo 12 cuando consideremos la señalización transmembrana y también en capítulos posteriores en el contexto de las rutas metabólicas en las que participan.

El transportador de glucosa de los eritrocitos facilita el transporte pasivo

El metabolismo productor de energía del eritrocito depende de un suministro constante de glucosa que proviene del plasma sanguíneo, donde la concentración de glucosa se mantiene alrededor de 5 mM. La glucosa penetra en el eritrocito por transporte pasivo vía un transportador de glucosa específico, llamado GLUT1, a una velocidad unas 50.000 veces superior a la que atravesaría la membrana sin ser asistido.

El proceso de transporte de glucosa se puede describir por analogía con una reacción enzimática en la que el "sustrato" es la glucosa del exterior de la célula (S_{out}), el "producto" es la glucosa del interior (S_{in}) y el "enzima" es el transportador, T. Cuando se mide la velocidad inicial de captación de glucosa en función de la concentración externa de glucosa **(Fig. 11-28)**, la gráfica resultante es hiperbólica; a concentraciones externas de glucosa elevadas la velocidad de captación se acerca a V_{max}. Formalmente, un proceso de transporte de este tipo se puede describir según las ecuaciones

$$\begin{array}{ccc} S_{out} + T_1 & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & S_{out} \cdot T_1 \\ k_{-4}\Big\downarrow\Big\uparrow k_4 & & k_{-2}\Big\downarrow\Big\uparrow k_2 \\ S_{in} + T_2 & \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} & S_{in} \cdot T_2 \end{array}$$

en donde k_1, k_{-1}, y así sucesivamente, son las constantes de velocidad directa e inversa para cada paso; T_1 es la conformación del transportador en la que el sitio de unión de la glucosa apunta hacia el exterior (en contacto con el plasma sanguíneo) y T_2 la conformación en la que apunta hacia el interior. Dado que cada paso en la secuencia es reversible, el transportador es, en principio, capaz de transportar la glucosa tanto hacia el interior como al exterior de la célula. No obstante, con

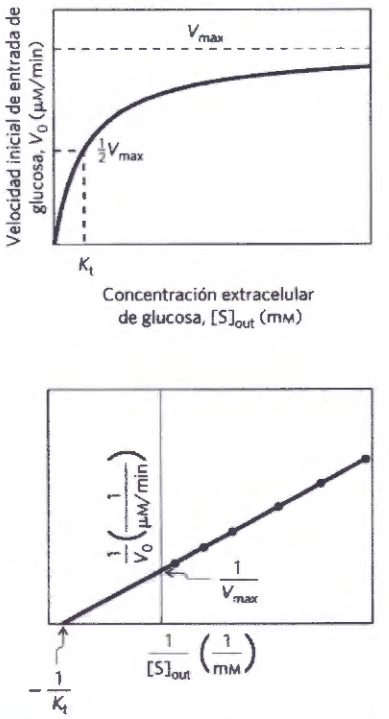


FIGURA 11-28 Cinética del transporte de glucosa a los eritrocitos. **(a)** La velocidad inicial de entrada de glucosa a un eritrocito, V_0, depende de la concentración inicial de glucosa en el exterior, $[S]_{out}$. **(b)** Gráfica doble-recíproca de los datos en (a). La cinética del transporte pasivo es análoga a la cinética de una reacción catalizada por un enzima. Compare estas gráficas con la Figura 6-11, y con la Figura 1 en el Recuadro 6-1. Obsérvese que K_t es análoga a K_m, la constante de Michaelis.

GLUT1, la glucosa siempre se desplaza a favor del gradiente de concentración, lo que normalmente quiere decir hacia *dentro* de la célula. La glucosa que entra en una célula generalmente se metaboliza de manera inmediata por lo que la concentración intracelular de glucosa es baja en comparación con la de la sangre.

Las ecuaciones de velocidad del transporte de glucosa se pueden deducir exactamente igual que para las reacciones catalizadas por enzimas (Capítulo 6), dando una expresión análoga a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_{out}}{K_t + [S]_{out}} \qquad (11\text{–}1)$$

en la que V_0 es la velocidad inicial de acumulación de glucosa en el interior de la célula cuando su concentración en el medio circundante es $[S]_{out}$ y la K_t ($K_{transporte}$) es una constante análoga a la constante de Michaelis, es decir una combinación de constantes de velocidad característica de cada sistema de transporte. Esta ecuación describe la velocidad *inicial* (la velocidad observada cuando $[S]_{in} = 0$. Como en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, la forma intersección-pendiente de la ecuación describe una gráfica lineal de $1/V_0$ frente $1/[S]_{out}$ a partir de la cual podemos obtener los valores de K_t y V_{max} (Fig. 11-28b). Cuando $[S]_{out} = K_t$, la velocidad de captación es $\frac{1}{2}V_{max}$; el proceso de transporte está semisaturado. La concentración de glucosa en la sangre, de 4,5 a 5 mM, próxima al valor de K_t, asegura que GLUT1 está casi saturado con sustrato y opera cerca de la V_{max}.

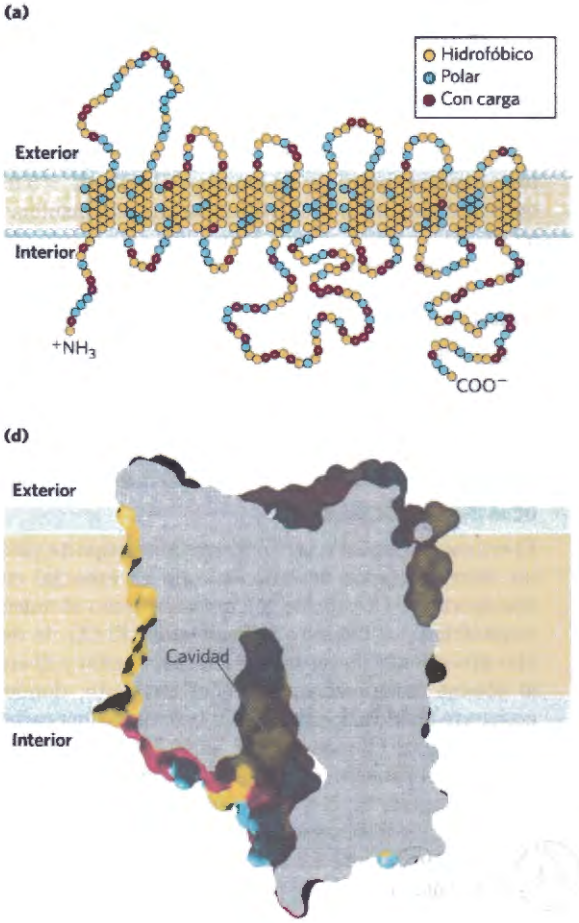


FIGURA 11-29 Topología de membrana del transportador de glucosa GLUT1. **(a)** Las hélices transmembrana están representadas como filas oblicuas (en ángulo) de tres o cuatro residuos aminoácidos, representando cada fila una vuelta de la hélice α. Nueve de las 12 hélices contienen tres o más residuos aminoácidos polares o con carga (azul o rojo), a menudo separados por varios residuos hidrofóbicos (amarillo). Esta representación de la topología no pretende representar la estructura tridimensional. **(b)** Un diagrama de rueda helicoidal muestra la distribución de residuos polares y apolares en la superficie de un segmento helicoidal. La hélice está esquematizada como si se observase a lo largo de su eje desde el extremo amino-terminal. Los residuos adyacentes en la secuencia lineal están conectados, y cada residuo está puesto alrededor de la rueda en la posición que ocupa en la hélice; recuerde que se requieren 3,6 residuos para una vuelta completa de la hélice α. En este ejemplo, los residuos polares (azul) están en una cara de la hélice y los residuos hidrofóbicos (amarillo) en la otra. Esto es, por definición, una hélice anfipática. **(c)** La asociación lateral de cuatro hélices anfipáticas, cada una con su cara polar orientada hacia la cavidad central, produce un canal transmembrana revestido con residuos polares (y con carga) disponible para interaccionar con la glucosa. **(d)** Estructura de GLUT1 humana en la conformación interior abierto determinada por cristalografía de rayos X. Esta visión en corte de la proteína muestra la larga cavidad central abierta hacia el interior y forrada con muchas cadenas laterales polares (azul). [Fuentes: (a, c) Información de M. Mueckler, *Eur. J. Biochem.* 219:713, 1994. (d) PDB ID 4PYP, D. Deng et al., *Nature* 510:121, 2014.]

Dado que en la conversión de S_{out} a S_{in} no se rompen ni se forman enlaces químicos, ni el "sustrato" ni el "producto" son intrínsecamente más estables y, por tanto, el proceso de entrada es totalmente reversible. Cuando $[S]_{in}$ se acerca a $[S]_{out}$, las velocidades de entrada y salida se igualan. Dicho sistema es, por consiguiente, incapaz de acumular glucosa dentro de las células a concentraciones superiores a las del medio circundante; simplemente consigue un equilibrio de la glucosa a ambos lados de la membrana a una velocidad mucho mayor de la que tendría lugar en ausencia de un transportador específico. GLUT1 es específico de la D-glucosa, para la que la K_t es aproximadamente 6 mM. Para los análogos próximos D-manosa y D-galactosa, que sólo difieren en la posición de un grupo hidroxilo, los valores de K_t son 20 y 30 mM, respectivamente, y para la L-glucosa, K_t es superior a 3.000 mM. De este modo, GLUT1 muestra los tres rasgos del transporte pasivo: velocidades de difusión elevadas a favor de un gradiente de concentración, saturabilidad y estereoespecificidad.

GLUT1 es una proteína integral de membrana (M_r ~ 56.000) con 12 segmentos hidrofóbicos, cada uno de los cuales forma una hélice que abarca la membrana **(Fig. 11-29a)**. Las hélices que tapizan el paso transmembrana de la glucosa son **anfipáticas**; en cada hélice, los residuos de un lado son predominantemente apolares mientras que los del otro lado son mayoritariamente polares. Esta estructura anfipática es evidente en un diagrama de rueda helicoidal (Fig. 11-29b). Un agrupamiento de hélices anfipáticas está ordenado de tal modo que sus lados polares se enfrentan entre sí con lo que tapizan un poro hidrofílico a través del cual puede pasar la glucosa (Fig. 11-29c). Al mismo tiempo sus lados hidrofóbicos interaccionan con los lípidos de membrana circundantes de modo que el efecto hidrofóbico estabiliza la estructura global del transportador.

Estudios estructurales del GLUT1 de mamíferos y sus análogos próximos de otros organismos sugieren que la proteína experimenta un ciclo a través de una serie de cambios conformacionales que interconvierten una forma (T_1) con su sitio de fijación de glucosa accesible solamente desde el lado extracelular seguida de una forma en la que la glucosa unida está secuestrada e inaccesible desde cualquiera de los lados hasta una forma (T_2) con el sitio de unión de glucosa abierto solamente al lado intracelular **(Fig. 11-30)**. La única forma de la proteína humana GLUT1 resuelta por cristalografía (Fig. 11-29d) es la forma abierta hacia el interior, T_2.

En el genoma humano se encuentran codificados doce transportadores de glucosa, cada uno con propiedades cinéticas, patrones de distribución tisular y función diferentes (Tabla 11-3). GLUT1, además de suministrar glucosa a los eritrocitos, también transporta glucosa a través de la barrera hemato-encefálica, suministrando la glucosa que es esencial para el metabolismo normal del cerebro. Los muy escasos

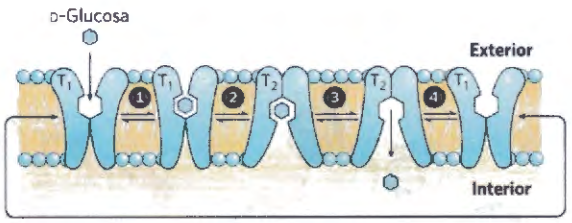


FIGURA 11-30 Modelo del transporte de glucosa a los eritrocitos por GLUT1. El transportador existe en dos conformaciones: T_1, con el sitio de unión a glucosa expuesto en la superficie externa de la membrana plasmática, y T_2, con el sitio de unión expuesto en la superficie interna. El transporte de glucosa tiene lugar en cuatro etapas. ❶ La glucosa del plasma sanguíneo se une a un sitio estereoespecífico en T_1, rebajando así la energía de activación para un cambio de conformación ❷ desde $glucosa_{out}$ T_1 a $glucosa_{in}$ T_2, efectuando el paso transmembrana de la glucosa. ❸ La glucosa es liberada desde T_2 al citoplasma, y ❹ el transportador vuelve a la conformación T_1 listo para transportar otra molécula de glucosa. Entre las formas T_1 y T_2 existe una forma intermedia (no mostrada aquí) en la que la glucosa está secuestrada dentro del transportador sin acceso a ninguno de los dos lados.

individuos con defectos en GLUT1 presentan una variedad de síntomas relacionados con el cerebro entre los que se incluyen ataques epilépticos, defectos del movimiento y del lenguaje y retraso en el desarrollo. Entre los cuidados estándar para tales individuos se cuentan una dieta cetogénica, que proporciona las cetonas que pueden servir como fuente energética alternativa para el cerebro En el hígado, GLUT2 transporta glucosa fuera de los hepatocitos cuando se degrada el glucógeno del hígado para reponer la glucosa sanguínea. GLUT2 tiene una K_t elevada (≥17 mM) de manera que puede responder a niveles elevados de glucosa intracelular (debido a la degradación del glucógeno) incrementando el transporte hacia el exterior. Los músculos esquelético y cardíaco así como el tejido adiposo, tienen otro transportador de glucosa, GLUT4 (K_t = 5 mM), que se distingue por su estimulación por insulina: su actividad aumenta cuando la insulina señala que existe una elevada concentración de glucosa en sangre, con lo que se incrementa de este modo la velocidad de captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (el Recuadro 11-2 describe el efecto de la insulina sobre este transportador). ■

El intercambiador de cloruro-bicarbonato cataliza el cotransporte electroneutro de aniones a través de la membrana plasmática

El eritrocito contiene otro sistema de transporte pasivo, un intercambiador de aniones, que es esencial en el transporte de CO_2 desde tejidos tales como el músculo esquelético y el hígado a los pulmones. El CO_2 de desecho procedente de los tejidos en respiración y liberado al plasma sanguíneo entra en el eritrocito, donde se convierte en bicarbonato (HCO_3^-) por el enzima carbónico anhidrasa. (Recuerde que el HCO_3^- es el principal tampón del pH sanguíneo; véase la Fig. 2-21). El HCO_3^- vuelve a entrar en el plasma sanguíneo para ser transportado a los pulmones **(Fig. 11-31)**. Debido a que el HCO_3^- es mucho más soluble en el plasma sanguíneo que el CO_2, esta ruta indirecta aumenta la capacidad de la

TABLA 11-3 Transportadores de glucosa en humanos temperaturas

Transportador	Tejido(s) donde se expresa	K_t (mM)	Función/características[a]
GLUT1	Eritrocitos, barrera hemato-encefálica, Placenta, mayoría de tejidos a baja concentración	3	Captación basal de glucosa, defectuoso en la enfermedad De Vivo
GLUT2	Hígado, islotes pancreáticos, intestino, riñón	17	En el hígado y riñón, eliminación de exceso de glucosa de la sangre; en el páncreas, regulación de la liberación de insulina
GLUT3	Cerebro (neurona), testículos (esperma)	1.4	Captación basal de glucosa; alta velocidad de recambio
GLUT4	Músculo, grasa, corazón	5	Actividad incrementada por la insulina
GLUT5	Intestino (principalmente), testículos, riñón	6[b]	Principalmente transporte de fructosa
GLUT6	Bazo, leucocitos, cerebro	>5	Posiblemente sin función transportadora
GLUT7	Intestino delgado, colon, testículos, próstata	0.3	—
GLUT8	Testículos, acrosoma de la esperma	~2	—
GLUT9	Hígado, riñón, intestino, pulmón, placenta	0.6	Transportador de urato y glucosa en hígado, riñón
GLUT10	Corazón, pulmón, cerebro, hígado, músculo, páncreas, placenta, riñón	0.3[c]	Transportador de glucosa y galactosa
GLUT11	Corazón, músculo esquelético	0.16	Transportador de glucosa y fructosa
GLUT12	Músculo esquelético, corazón, próstata, placenta	—	—

Fuentes: Información sobre la localización de M. Mueckler and B. Thorens, *Mol. Aspects, Med.* 34:121, 2013. Valores de K_t para la glucosa de R. Augustin *IUBMB Life* 62:315, 2010.

[a] K_m para fructosa.

[b] K_m para2-desoxiglucosa.

RECUADRO 11-1 MEDICINA — Transporte defectuoso de glucosa y de agua en dos formas de diabetes

Cuando la ingestión de una comida rica en glúcidos hace que el nivel de glucosa en la sangre exceda la concentración normal entre comidas (aproximadamente 5 mM), los miocitos del músculo cardíaco y del músculo esquelético captan el exceso de glucosa (que se almacena en forma de glucógeno) así como los adipocitos (que la convierten en triacilgliceroles). El transportador de glucosa GLUT4 interviene en la captación de glucosa por los miocitos y adipocitos. Entre comidas, la membrana plasmática de estas células contiene algo de GLUT4, pero la mayor parte (90%) está secuestrada en las membranas de pequeñas vesículas intracelulares (Fig.1). La insulina liberada por el páncreas en respuesta a la alta glucosa sanguínea provoca, en cuestión de minutos, el desplazamiento de estas vesículas hacia la membrana plasmática, con la que se fusionan, aportando moléculas de GLUT4 a la membrana plasmática (véase la Fig. 12-20). Con más moléculas de GLUT4 en acción, la velocidad de captación de glucosa aumenta 15 veces o más. Cuando los niveles de glucosa en la sangre vuelven a la normalidad, disminuye la liberación de insnlina y la mayoría de las moléculas de GLUT4 se eliminan de la membrana plasmática y se almacenan en vesículas.

En la diabetes mellitus tipo I (dependiente de insulina), la incapacidad para liberar insulina (y, por lo tanto, para movilizar los transportadores de glucosa) provoca una baja velocidad de captación de glucosa en músculo y tejido adiposo. Una consecuencia de ello, es un período prolongado de altos niveles de glucosa en sangre después de una ingesta rica en glúcidos. Esta condición es la base de la prueba de tolerancia a la glucosa usada para diagnosticar la diabetes (Capítulo 23).

La permeabilidad al agua de las células epiteliales que recubren el conducto colector del riñón es debida a la presencia de una acuaporina (AQP2) en sus membranas plasmáticas apicales (en la cara de la luz del conducto). La vasopresina (hormona antidiurética, ADH) regula la retención del agua movilizando moléculas de AQP2 almacenadas en las membranas de vesículas dentro de las células epiteliales, de forma muy parecida a como la insulina moviliza el GLUT4 en el músculo y el tejido adiposo. Cuando las vesículas se fusionan con la membrana plasmática de la célula epitelial, la permeabilidad al agua aumenta drásticamente y se reabsorbe más agua en el conducto colector que se retorna a la sangre. Cuando los niveles de vasopresina disminuyen, se resecuestra AQP2 dentro de las vesículas, reduciendo la retención de agua. En la enfermedad humana relativamente poco común diabetes insípida, un defecto genético en AQP2 provoca una reabsorción defectuosa de agua por el riñón. El resultado es la excreción de grandes volúmenes de orina muy diluida. Si el individuo bebe suficiente agua para reemplazar la que se ha perdido por la orina, no se producen consecuencias médicas graves, pero una ingestión insuficiente de agua conduce a deshidratación y desequilibrio de los electrolitos de la sangre lo que puede producir fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular e incluso la muerte.

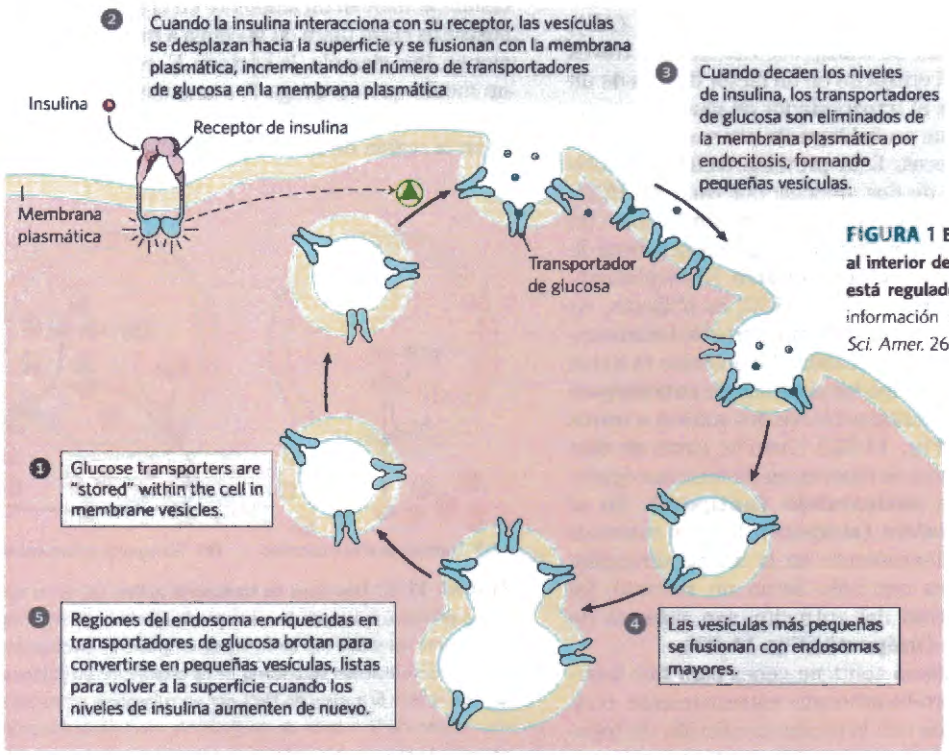


FIGURA 1 El transporte de glucosa al interior de un miocito por GLUT4 está regulado por insulina. [Fuente: información deF. E. Lienhard et al., *Sci. Amer.* 266 (enero): 86, 1992.]

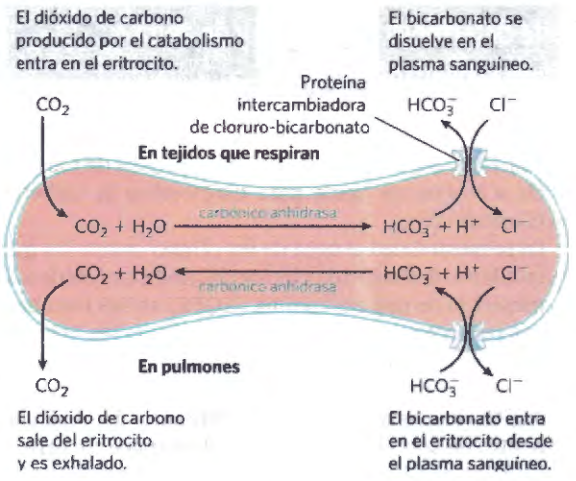


FIGURA 11-31 Intercambiador de cloruro-bicarbonato de la membrana de eritrocito. Este sistema cotransportador permite la entrada y salida de HCO_3^- sin cambios en el potencial de membrana. Su papel es incrementar la capacidad transportadora de CO_2 de la sangre. La mitad superior de la figura ilustra los acontecimientos que tienen lugar en los tejidos en respiración; la mitad inferior los acontecimientos en los pulmones.

sangre para transportar dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones. En los pulmones, el HCO_3^- vuelve a entrar en el eritrocito y se convierte en CO_2 que es finalmente liberado en el espacio pulmonar y exhalado. Para que esta lanzadera sea efectiva se requiere un movimiento muy rápido del HCO_3^- a través de la membrana del eritrocito. (Tal como se describe en el Capítulo 5 (pp. 169-171), existe un segundo mecanismo para llevar el CO_2 desde el tejido al pulmón, en el que tiene lugar la unión reversible del CO_2 a la hemoglobina.)

El intercambiador de cloruro-bicarbonato, también llamado proteína intercambiadora de aniones (AE), aumenta la velocidad de transporte del HCO_3^- a través de la membrana del eritrocito en un factor de más de un millón. Al igual que el transportador de glucosa, es una proteína integral que probablemente abarca la membrana al menos 12 veces. Esta proteína facilita el movimiento simultáneo de dos aniones: por cada ión HCO_3^- que se traslada en una dirección, se traslada también un ión Cl^- en la dirección opuesta sin transferencia neta de carga; el intercambio es **electroneutro**. El acoplamiento de los movimientos de Cl^- y HCO_3^- es obligado; en ausencia de cloruro, se para el transporte de bicarbonato. En este aspecto, el intercambiador aniónico es típico de los sistemas, denominados sistemas de **cotransporte**, que trasladan simultáneamente dos solutos a través de la membrana **(Fig. 11-32)**. Cuando, como en este caso, los dos sustratos se mueven en direcciones opuestas, el proceso es **antiparalelo (antiport)**. En el **cotransporte paralelo (simport),** los dos sustratos se trasladan simultáneamente en la misma dirección. Los transportadores que sólo llevan un sustrato, tal como el de la glucosa del eritrocito, son sistemas de **transporte único (uniport) (Fig. 11-33).**

El genoma humano contiene genes para tres intercambiadores cloruro-bicarbonato estrechamente relacionados, todos ellos con la misma predicción de topología transmembrana. Los eritrocitos contienen el trans-

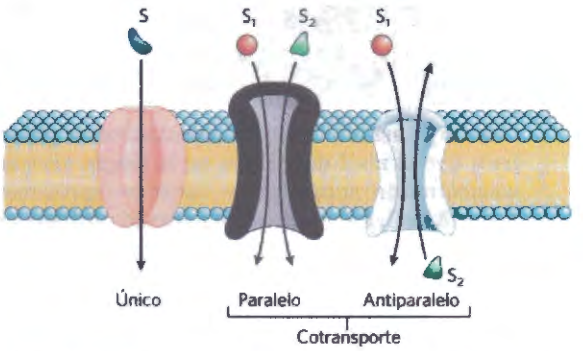


FIGURE 11-32 Three general classes of transport systems. Transporters differ in the number of solutes (substrates) transported and the direction in which each solute moves. Examples of all three types of transporter are discussed in the text. Note that this classification tells us nothing about whether these are energy-requiring (active transport) or energy-independent (passive transport) processes.

portador AE1, el AE2 predomina en el hígado y el AE3 está presente en las membranas plasmáticas del cerebro, corazón y retina. También se encuentran intercambiadores de aniones similares en plantas y microorganismos.

El transporte activo da lugar al movimiento de soluto contra un gradiente de concentración o un gradiente electroquímico

En el transporte pasivo, la especie transportada siempre se mueve a favor de su gradiente electroquímico y no se acumula por encima de la concentración de equilibrio. Por el contrario, el transporte activo, da lugar a la acumulación de un soluto por encima del punto de equilibrio. El transporte activo es esencial cuando las células actúan en un ambiente en el que están presentes sustratos clave fuera de la célula a muy bajas concentraciones. Por ejemplo, la bacteria *E. coli* puede crecer en un medio que contenga P_i a una concentración de solo 1 μM aun cuando la célula deba mantener los niveles de P_i en la región de milimolar. (El Ejemplo resuelto 11-2,

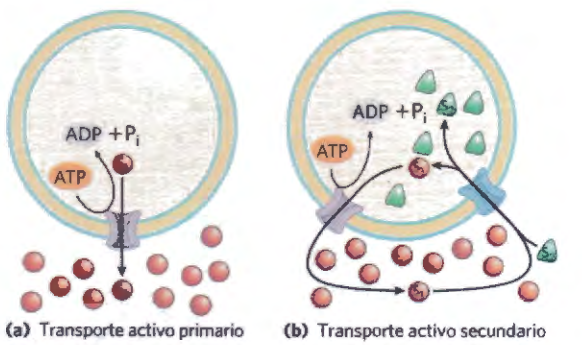


FIGURA 11-33 Dos tipos de transporte activo. (a) En el transporte activo primario, la energía liberada por la hidrólisis de ATP impulsa el movimiento del soluto (S_1) en contra de un gradiente electroquímico. **(b)** En el transporte activo secundario, se ha establecido un gradiente de un ión (designado S_1 a menudo Na^+) por un transporte activo primario. El movimiento de S_1 a favor de su gradiente electroquímico proporciona entonces la energía para impulsar el cotransporte de un segundo soluto (S_2) contra su gradiente electroquímico.

de más adelante, describe otra situación de este tipo, que requiere que las células bombeen Ca^{2+} hacia fuera a través de la membrana plasmática). El transporte activo está desfavorecido termodinámicamente (endergónico) y se da solamente cuando está acoplado (directa o indirectamente) a un proceso exergónico tal como la absorción de luz solar, una reacción de oxidación, la rotura del ATP, o el flujo concomitante de otra especie química a favor de su gradiente electroquímico. En el transporte activo primario, la acumulación de soluto está acoplada directamente a una reacción química exergónica tal como la conversión de ATP en ADP + P_i **(Fig. 11-33)**. El transporte activo secundario tiene lugar cuando el transporte endergónico (cuesta arriba) de un soluto está acoplado al flujo exergónico (cuesta abajo) de un soluto diferente que fue bombeado previamente cuesta arriba mediante un transporte activo primario.

La cantidad de energía necesaria para el transporte de un soluto contra un gradiente puede calcularse a partir del gradiente de concentración inicial. La ecuación general para la variación de energía libre en el proceso químico que transforma el sustrato (S) en producto (P) es

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([P]/[S]) \qquad (11\text{-}2)$$

en donde $\Delta G'^{\circ}$ es la variación de energía libre estándar, R es la constante de los gases, 8,315 J/mol·K, y T es la temperatura absoluta. Cuando la „reacción" es simplemente el transporte de un soluto desde una región en donde su concentración es C_1 a otra región en la que su concentración es C_2, no se forman ni rompen enlaces por lo que la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$, es cero. La variación de energía libre para el transporte, ΔG_t, es pues

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) \qquad (11\text{-}3)$$

Si hay, digamos, una diferencia de diez veces en la concentración entre los dos compartimientos, el coste de trasladar 1 mol de un soluto no cargado a 25 °C cuesta arriba a través de una membrana que separa los compartimientos es

$$\Delta G_t = (8.315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K}) \ln (10/1) = 5{,}700 \text{ J/mol} = 5.7 \text{ kJ/mol}$$

La ecuación 11-3 es válida para todos los solutos sin carga.

EJEMPLO RESUELTO 11-1 Coste energético de bombear un soluto sin carga

Calcule el coste energético (variación de energía libre) de bombear un soluto no cargado contra un gradiente de concentración de 10^4 veces, a 25 °C,

Solución: Empiece con la Ecuación 11-3. Sustituya (C_2/C_1) por 1,0 x 10^4, R por 8,315 J/mol·K y T por 298:

$$\begin{aligned}\Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) \\ &= (8.315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K})(1.0 \times 10^4) \\ &= 23 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Cuando el soluto es un *ión*, su movimiento sin un contraión correspondiente da lugar a la separación endergónica de cargas positivas y negativas formando un potencial eléctrico; un proceso de transporte de este tipo se dice que es **electrogénico**. El coste energético de mover un ión depende del potencial electroquímico (Fig. 11-25), la suma de los gradientes químico y eléctrico:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + ZF \Delta\psi \qquad (11\text{-}4)$$

donde Z es la carga del ión, F la constante de Faraday (96.480 J/V·mol) y $\Delta\psi$ es el potencial eléctrico transmembrana (en voltios). Las células eucarióticas tienen, típicamente, potenciales a través de sus membranas plasmáticas del orden de 0,05 V, (con el interior negativo respecto al exterior) por lo que el segundo término de la ecuación 11-4 puede contribuir significativamente a la variación total de energía libre para el transporte de un ión. La mayoría de células mantienen diferencias de más de diez veces en la concentración de iones a través de sus membranas plasmáticas o intracelulares por lo que en muchas células y tejidos el transporte activo constituye un proceso principal de consumo de energía.

EJEMPLO RESUELTO 11-2 Coste energético de bombear un soluto cargado

Calcule el coste energético (variación de energía libre) de bombear Ca^{2+} desde el citosol, en donde su concentración es alrededor de 1,0 x 10^{-7} M, al fluido extracelular en donde su concentración es alrededor de 1,0 mM. Suponga una temperatura de 37 °C (temperatura corporal de un mamífero) y un potencial transmembrana estándar de 50 mV (negativo en el interior) para la membrana plasmática.

Solución: Este es un caso en el que se ha de consumir energía para contrarrestar dos fuerzas que actúan sobre el ión transportado: el potencial de membrana y la diferencia de concentración a través de la membrana. Estas fuerzas se expresan en los dos términos del miembro derecho de la Ecuación 11-4:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + ZF \Delta\psi$$

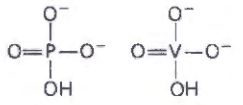
En la que el primer término describe el gradiente químico y el segundo el potencial eléctrico:
En la Ecuación 11-4 sustituya R por 8,315 J/mol·K, T por 310 K, C_2 por 1,0 x 10^{-3}, C_1 por 1,0 x 10^{-7}, F por 96.500 J/V·mol, Z por +2 (la carga de un ión Ca^{2+}) y $\Delta\psi$ por 0,050 V. Observe que el potencial transmembrana es 50 mV (negativo el interior) por lo que el cambio en potencial cuando un ión se desplaza desde el interior al exterior es 50 mV.

$$\begin{aligned}\Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) + ZF \Delta\psi \\ &= (8.315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K}) \ln \frac{(1.0 \times 10^{-3})}{(1.0 \times 10^{-7})} \\ &\quad + 2(96{,}500 \text{ J/V·mol})(0.050 \text{ V}) \\ &= 33 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

El mecanismo del transporte activo es de importancia fundamental en biología. Tal como veremos en los Capítulos 19 y 20, la formación de ATP en las mitocondrias y cloroplastos tiene lugar mediante un mecanismo que es, fundamentalmente, el transporte de iones impulsado por el ATP operando a la inversa. La energía disponible a partir del flujo espontáneo de protones a través de una membrana se puede calcular mediante la Ecuación 11-4; recuerde que para el flujo *a favor* de un gradiente electroquímico, el signo de ΔG es negativo mientras que el valor de ΔG para el transporte de iones *en contra* de un gradiente electroquímico tiene un signo positivo.

Las ATPasas tipo P experimentan fosforilación durante sus ciclos catalíticos

La familia de transportadores activos denominados **ATPasas tipo P** son transportadores de cationes que se fosforilan reversiblemente por acción del ATP (de ahí el nombre tipo P) durante el ciclo de transporte. La fosforilación obliga a un cambio de conformación que es crucial para el transporte del catión a través de la membrana. El genoma humano codifica al menos 70 ATPasas tipo P que comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos y topología, especialmente cerca del residuo Asp que experimenta fosforilación. Todas son proteínas integrales en la que pueden predecirse ocho o diez regiones que abarcan la membrana en un polipéptido único (tipo III en la Fig. 11-9) y todas son sensibles a la inhibición por el análogo del estado de transición **vanadato** que imita el fosfato bajo ataque nucleofílico por una molécula de agua.



Las ATPasas de tipo P están distribuidas muy ampliamente en eucariotas y bacterias. La Na^+K^+ ATPasa (cotransportador antiparalelo de iones Na^+ y K^+) y la H^+ ATPasa de plantas y hongos establecen el potencial

FIGURA 11-34 Estructura general de las ATPasas tipo P. (a) Las ATPasas tipo P tienen tres dominios citoplasmáticos (A, N y P) y dos dominios transmembrana (T y S) que constan de múltiples hélices. El dominio N (nucleótido) une ATP y Mg^{2+} y tiene actividad proteína quinasa que fosforila el residuo específico Asp que se encuentra en el dominio P (fosforilación) de todas las ATPasas tipo P. El dominio A (actuador) tiene actividad proteína fosfatasa y elimina el grupo fosforilo del residuo Asp en cada ciclo catalítico de la bomba. Un dominio de transporte (T) con seis hélices transmembrana incluye la estructura transportadora de iones mientras que otras cuatro hélices transmembrana constituyen el dominio de soporte (S) que propociona soporte físico al dominio de transporte, aparte de poder tener otra función especializada en ciertas ATPasas tipo P. Los sitios de unión de los iones que han de ser transportados están cerca del centro de la membrana, 40 a 50 Å del residuo Asp fosforilado, con lo que la fosforilación-desfosforilación no afecta *directamente* a la unión. El dominio A comunica movimientos de los dominios N y P a los sitos de unión de iones. **(b)** Diagrama de cintas de la Ca^{2+} ATPasa (bomba SERCA) (PDB 1T5S). El ATP se une al dominio N y los iones Ca^{2+} que se han de tranportar al dominio T. **(c)** Otras ATPasas tipo P tienen estructuras de dominios, y posiblemente mecanismos como los de la bomba SERCA: Na^+K^+ ATPasa, H^+ ATPasa de la membrana plasmática y H^+K^+ ATPasa gástrica. [Fuentes: (a) Información de M. Bublitz et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20:431, 2010, Fig. 1. (b) PDB ID 1SU4, C. Toyoshima et AL., *Nature* 405:647, 2000. (c) Na^+K^+ ATPasa: PDB ID 3KDP J. Preben Morth et al., *Nature* 450:1043, 2007. H^+ ATPasa: PDB ID 3B8C, B. P. Pedersen et AL., *Nature* 450:1111, 2007; H^+K^+ ATPasa: modelado según PDB ID 3B8E. J. Preben et al., *Nature* 450:1043, 2007.]

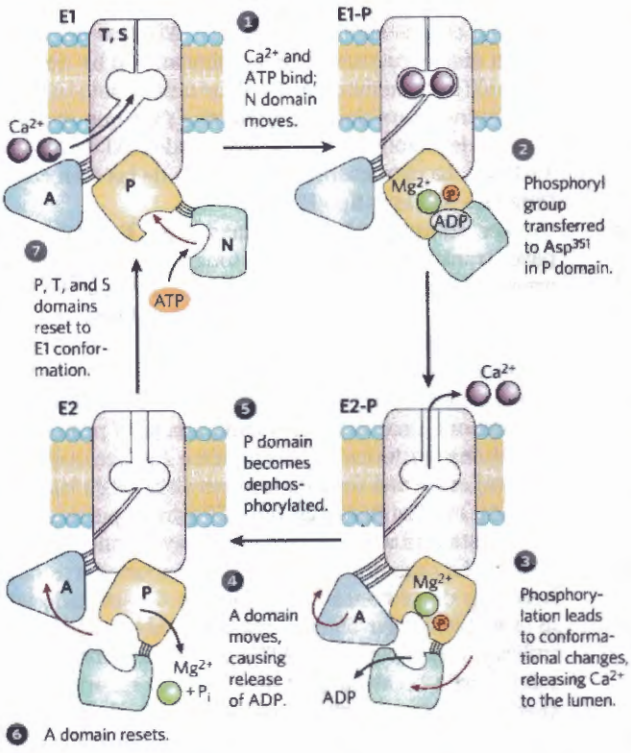
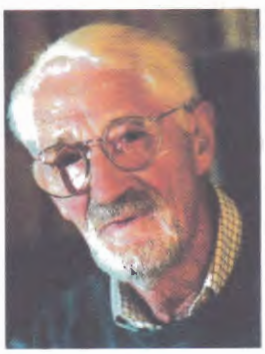


FIGURA 11-35 Mecanismo propuesto para la bomba SERCA. El ciclo de transporte empieza con la proteína en la conformación E1, con los sitios de unión de Ca^{2+} encarados hacia el citosol. Se unen los dos iones Ca^{2+}, a continuación se une el ATP al transportador y fosforila el Asp^{351}, formando E1-P. La fosforilación favorece la segunda conformación, E2-P, en la que los sitos de unión de Ca^{2+}, en este momento con una afinidad para el Ca^{2+} reducida, están accesibles en el otro lado de la membrana (la luz o espacio extracelular), con lo que difunde el Ca^{2+} liberado. Finalmente, E2-P se desfosforila volviendo la proteína a la conformación E1 para otra ronda de transporte. [Fuente: Información de W. Kühlbrandt, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:282, 2004.]

dos iones Ca^{2+} a través de la membrana y convierte un ATP en ADP y P_i. El ATP tiene dos papeles en este mecanismo, uno catalítico y otro modulador. El papel de la unión del ATP y la transferencia de fosforilo al enzima es llevar a cabo la interconversión de las dos conformaciones, E1 y E2, del transportador. En la conformación E1, los dos sitios de unión de Ca^{2+} están expuestos al lado citosólico del RE o del retículo sarcoplasmático y fijan Ca^{2+} con elevada afinidad. La unión del ATP y la fosforilación del Asp impulsan un cambio conformacional desde E1 a E2 que tiene como resultado la exposición de los sitios de unión de Ca^{2+} del lado de la luz de la membrana al tiempo que reduce grandemente su afinidad por el Ca^{2+} lo que conduce a la liberación de Ca^{2+} a la luz. Con este mecanismo, la energía liberada por hidrólisis del ATP durante un ciclo de fosforilación-desfosforilación impulsa el Ca^{2+} a través de la membrana contra un gran gradiente electroquímico.



Jens Skou
[Fuente: Lars Moeller/AP Images.]

electroquímico transmembrana de las células mediante el establecimiento de de gradientes iónicos a través de la membrana plasmática. Estos gradientes proporcionan la fuerza motriz para el transporte activo secundario y son también la base de la señalización eléctrica en las neuronas. En tejidos animales, las **bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA)** y la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática son transportadores simples de iones Ca^{2+}, que mantienen conjuntamente la concentración citoplasmática de Ca^{2+} por debajo de 1 μM. La bomba SERCA desplaza Ca^{2+} desde el citosol a la luz del retículo endoplasmático. Las células parietales que forran el estómago de los mamíferos tienen una ATPasa tipo P que bombea H^+ y K^+ al exterior de las células en el estómago, acidificando de este modo el contenido del estómago. Las flipasas de lípidos, tal como mencionamos anteriormente, están relacionadas tanto estructural como funcionalmente con los transportadores tipo P. Bacterias y eucariotas utilizan ATPasas de tipo P para bombear al exterior iones de metales pesados tóxicos tales como Cd^{2+} y Cu^{2+} fuera de las células.

Todas las bombas de tipo P tienen estructuras **(Fig. 11-34)** y mecanismos similares. El mecanismo propuesto para las ATPasas de tipo P tiene en cuenta los grandes cambios conformacionales y la fosforilación-desfosforilación del residuo Asp central del dominio P (fosforilación) que tiene lugar en cada ciclo catalítico. En la bomba SERCA **(Fig. 11-35)** cada ciclo catalítico mueve

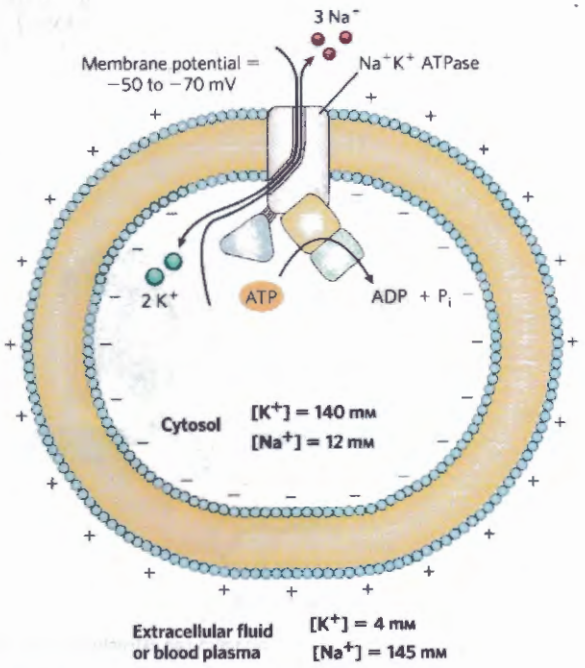


FIGURA 11-36 Papel de la Na+K+ ATPasa en células animales. En células animales, este sistema de transporte activo es responsable principalmente de establecer y mantener las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ y de generar el potencial transmembrana. Esto lo hace expulsando tres Na^+ de la célula por cada dos K^+ que introduce. El potencial eléctrico a través de la membrana plasmática es fundamental para la señalización eléctrica en las neuronas, y el gradiente de Na^+ se utiliza para impulsar el cotransporte de solutos cuesta arriba en muchos tipos celulares.

Se observa una variación de este mecanismo básico en la **Na^+K^+ ATPasa** de la membrana plasmática, descubierta por Jens Skou en 1957. Este cotransportador acopla la fosforilación-desfosforilación del residuo Asp crítico al movimiento simultáneo de Na^+ y K^+ en contra de sus gradientes electroquímicos. La Na^+K^+ ATPasa es responsable de mantener concentraciones bajas de Na^+ y elevadas de K^+ en la célula con respecto al fluido extracelular **(Fig. 11-36)**. Por cada molécula de ATP convertida en ADP y P_i, el transportador mueve dos iones K^+ hacia el interior y 3 iones Na^+ hacia el exterior a través de la membrana plasmática. El cotransporte es, por tanto, electrogénico: crea una separación neta de carga a través de la membrana; en los animales, esto produce el potencial de membrana de -50 a -70 mV (interior negativo en relación al exterior) que es característico de la mayoría de células y que es esencial para la conducción de potenciales de acción en las neuronas. El papel central de la Na^+K^+ ATPasa queda reflejado en la energía invertida en esta reacción sencilla: ¡alrededor del 25% del consumo total de energía de un ser humano en reposo!

Las ATPasas tipo V y tipo F son bombas de protones impulsadas por el ATP

Las **ATPasas tipo V,** una clase de ATPasas transportadoras de protones relacionadas estructuralmente, son responsables de la acidificación de los compartimientos intracelulares en muchos organismos (de ahí *V*, vacuolar). Las vacuolas de hongos y plantas superiores mantienen el pH entre 3 y 6, bastante menos que el del citosol circundante (pH 7,5), gracias a la acción de bombas protónicas de este tipo. Las ATPasas tipo V también son responsables de la acidificación de los lisosomas, endosomas, complejo de Golgi y vesículas secretoras en células animales. Todas las ATPasas del tipo V tienen una estructura compleja similar, con un dominio integral (transmembrana) (V_o) que actúa como un canal de protones y un dominio periférico (V_1) que contiene el sitio de unión de ATP y la actividad ATPasa **(Fig. 11-37a)**. La estructura es similar a la de las bien caracterizadas ATPasas tipo F.

Los transportadores **ATPasa tipo F** catalizan el paso transmembrana de protones contra gradiente impulsado por la hidrólisis del ATP. La designación "tipo F" viene de la identificación de estas ATPasas como *f*actores de acoplamiento de energía. El complejo de proteína integral de membrana F_o (Fig. 11-37b; el subíndice *o* denota su inhibición por el fármaco *o*ligomicina) proporciona una ruta transmembrana para protones, y la proteína periférica F_1 (el subíndice *1* indica que fue el primero entre una serie de factores aislados de las mitocondrias) utiliza la energía del ATP para impulsar protones cuesta arriba (a una región de mayor concentración de H^+). La organización F_oF_1 de transportadores bombeadores de protones ha de haberse desarrollado muy al principio de la evolución. Bacterias tales como *E. coli* utilizan un complejo F_oF_1 ATPasa en su membrana plasmática para bombear protones hacia el exterior mientras que las arquebacterias poseen una bomba de protones homóloga próxima, la A_oA_1 ATPasa.

Al igual que todos los enzimas las ATPasas tipo F catalizan sus reacciones en ambas direcciones. Por tanto, un gradiente de protones suficientemente elevado puede suministrar la energía para impulsar la reacción inversa, la síntesis de ATP (Fig. 11-37b). Cuando funcionan en esta dirección, las ATPasas tipo F se llaman más apropiadamente **ATP sintasas**. Las ATP sintasas son de importancia crucial en la producción de ATP por la mitocondria durante la fosforilación oxidativa y en los cloro-

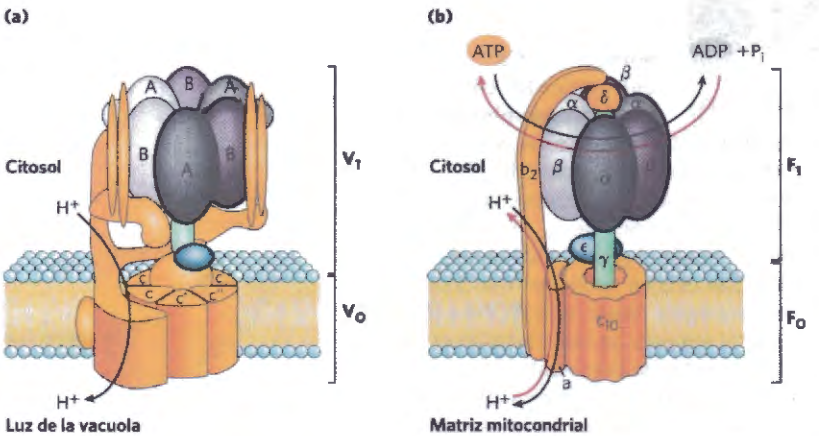


FIGURA 11-37 Dos bombas de protones con estructuras similares. La H^+ ATPasa V_oV_1 utiliza ATP para bombear protones al interior de las vacuolas y lisosomas lo que crea su bajo pH interno. Tiene un dominio integral (naranja) que tiene múltiples copias idénticas de subunidades c y un dominio periférico, que se proyecta al citosol y que contiene los sitos de hidrólisis de ATP localizados en tres subunidades B idénticas (púrpura). **(b)** La ATPasa F_oF_1/ATP sintasa de mitocondria tiene un dominio integral, F_o (naranja), con múltiples copias de la subunidad c y un dominio periférico, F_1 que consta de tres subunidades α, tres subunidades β y un eje central unido al dominio integral. F_o, y posiblemente V_o, proporciona un canal transmembrana a través del cual se bombean protones a medida que se hidroliza ATP en las subunidades β de F_1 (subunidades B de V_1). El extraordinario mecanismo mediante el cual se acopla la hidrólisis del ATP con el movimiento de protones se describe en detalle en el Capítulo 19. Interviene una rotación de F_o en el plano de la membrana. Las estructuras de las ATPasas V_oV_1 y sus análogos ATPasa A_oA_1 (de arquebacterias) y CF_oCF_1 (de cloroplastos) son esencialmente similares a la de F_oF_1. También se conservan sus mecanismos. Un transportador de protones accionado por el ATP también puede catalizar la síntesis de ATP (flechas rojas) a medida que los protones fluyen *a favor* de su gradiente electroquímico. Esta es la reacción central en los procesos de la fosforilación oxidativa y fotofosforilación descritos en detalle en los Capítulos 19 y 20.

plastos durante la fotofosforilación, así como en bacterias y arquebacterias. El gradiente de protones necesario para impulsar la síntesis de ATP se establece por otros tipos de bombas de protones accionadas por la oxidación de sustratos o por la luz solar. Daremos una descripción detallada de estos procesos en los Capítulos 19 y 20.

Los transportadores ABC utilizan ATP para impulsar el transporte activo de una amplia gama de sustratos

Los **transportadores ABC** constituyen una extensa familia de transportadores dependientes de ATP que bombean aminoácidos, péptidos, proteínas, iones metálicos, diversos lípidos, sales biliares y muchos compuestos hidrofóbicos, incluidos medicamentos, fuera de las células contra un gradiente de concentración. Muchos transportadores ABC están localizados en la membrana plasmática, pero algunos se encuentran en el RE y en las membranas de mitocondrias y lisosomas. Todos los miembros de esta familia tienen dos dominios de unión de ATP ("cassettes") que proporcionan a la familia su nombre (transportadores *A*TP-*b*inding *c*assette) y dos dominios transmembrana, cada uno de los cuales contiene seis hélices transmembrana. En algunos casos, todos estos dominios se encuentran en un único polipéptido largo; otros transportadores ABC tienen dos subunidades en las que cada una aporta un dominio de unión de nucleótido (NBD) y un dominio con seis hélices transmembrana. Se han resuelto las estructuras de formas homólogas de un transportador ABC del nematodo *Caenorhabditis elegans* y de la bacteria *Staphylococcus aureus* **(Fig. 11-38)** creyéndose que representan las dos formas extremas que adopta la proteína durante un ciclo de transporte. Una tiene su sitio de unión de sustrato expuesto en un lado de la membrana mientras que la otra lo tiene en el lado opuesto. Los sustratos se desplazan a través de la membrana cuando se interconvierten las dos formas, impulsados por la hidrólisis de ATP (Fig. 11-38c). Los NBD de todas las proteínas ABC tienen secuencias similares y, probablemente, también su estructura tridimensional. Constituyen el motor molecular conservado que puede acoplarse a una gran variedad de dominios transmembrana, cada uno capaz de bombear un sustrato específico a través de una membrana. Cuando se acoplan de esta manera, el motor impulsado por ATP desplaza solutos contra un gradiente de concentración, con una estequiomnetría de aproximadamente un ATP hidrolizado por molécula de sustrato transportada.

El genoma humano contiene, al menos, 48 genes que codifican trasportadores ABC (Tabla 11-4). Algunos de estos transportadores son muy específicos para un solo sustrato; otros son más promiscuos, capaces de transportar medicamentos que las células, presumiblemente, nunca encontraron durante su evolución. Muchos transportadores ABC actúan en el mantenimiento de la bicapa lipídica, tales como las flopasas que desplazan lípidos desde una cara de la bicapa a la opuesta. Otros muchos son necesarios en el transporte de esteroles, derivados de esteroles y ácidos grasos al torrente circulatorio a través de todo el cuerpo. Por ejemplo, la maquinaria celular que exporta el exceso de colesterol incluye un transportador ABC (véase la Fig. 21-47). Mutaciones en los genes que codifican algunas de estas proteínas contribuyen a la aparición de varias enfermedades genéticas entre las que se incluyen el fallo hepático, la degeneración de la retina y la enfermedad de Tangier. La proteína *r*eguladora de la conductancia *t*ransmembrana de la *f*ibrosis *q*uísitca (CFTR, del inglés *c*ystic *f*ibrosis

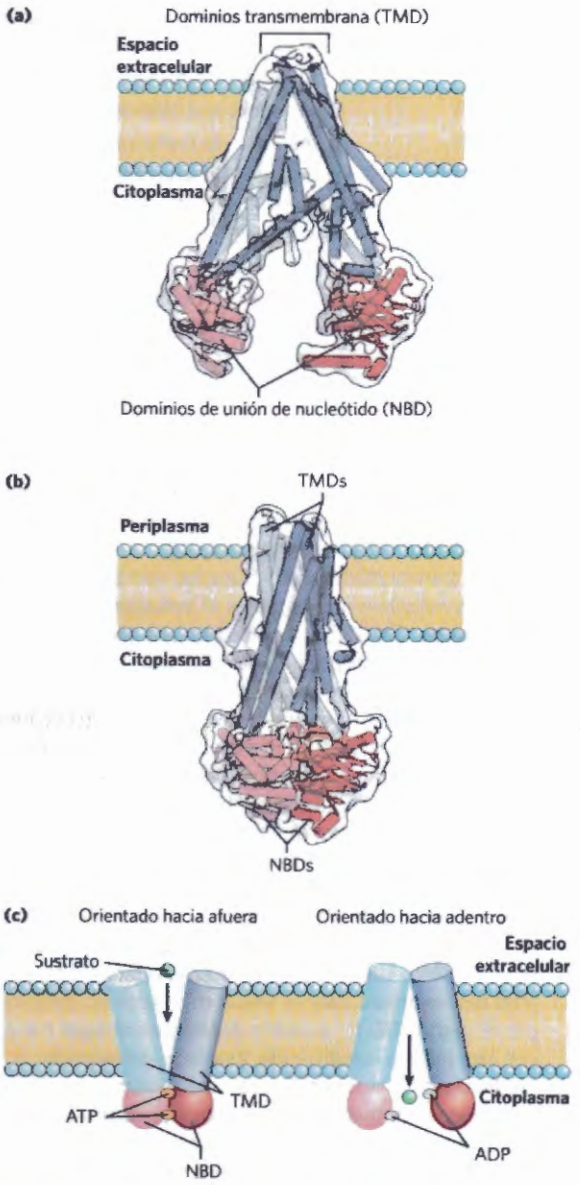


FIGURA 11-38 Dos transportadores ABC. (a) El transportador multifármacos ABCB1 de *C. elegans*, análogo al MDR1 humano, en su forma orientada hacia el interior. La proteína, tiene dos mitades homólogas cada una con seis hélices transmembrana en dos dominios transmembrana (TMD; azul) y un dominio de unión de nucleótido (NBD; rojo). **(b)** Una proteína homóloga, Sav1866 de*S. Aureus*, en la forma que se supone se orienta hacia el exterior, con su sitio de unión de sustrato accesible solamente desde el espacio extracelular. **(c)** Mecanismo propuesto para el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte. El sustrato se une al transportador en el lado citoplasmático, con ATP unido a los sitios NBD. Al unirse el sustrato e hidrolizarse el ATP un cambio conformacional expone el sustrato a la cara exterior y disminuye la afinidad del transportador hacia su sustrato; el sustrato difunde lejos del transportador hacia el espacio extracelular. Compare este proceso con el modelo de transporte de glucosa de la Fig. 11-30. [Fuentes: (a) PDB ID 4F4C, M. S. Jin et al., *Nature* 490:566, 2012. (b) PDB ID 2HYD, R. J. Dawson and K. P. Locher, *Nature* 443:180, 2006.]

TABLA 11-4 Algunos transporatadores ABC en humanos

Gen(es)	Función/características	Discusión en el texto
ABCA1	Transporte inverso del colesterol; su defecto produce la enfermedad de Tangier	pp. 851-852
ABCA4	Solo en receptores visuales, exportación del retinal todo-*trans*	p. 456, Fig. 12-14
ABCB1	P-glucoproteína 1 de resistencia multifármacos; transporte a través de la barrera hemato-encefálica	—
ABCB4	Resistencia multifármacos; transporte de fosfatidilcolina en la bilis	—
ABCB6	Transporte de porfirinas a la mitocondria para la síntesis de hemo	pp. 880-882
ABCB11	Transporte de sales biliares fuera de los hepatocitos	p.650, Fig. 17-1
ABCC6	Receptor de sulfonilurea; diana del fármaco glipizide en la diabetes de tipo 2	p. 933, Fig. 23-29
ABCG2	Proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP); principal exportador de fármacos anticancerosos	—
ABCG5, ABCG8	Actúan conjuntamente para limitar la captación de esteroles por el intestino	p. 418
ABCC7	CFTR (canal de Cl^-); su defecto da lugar a la fibrosis quística	p. 417; Recuadro 11-2

*t*ransmembrane conductance *r*egulator) de la membrana plasmática es un caso interesante de proteína ABC que es un canal iónico (para Cl^-), regulado por hidrólisis de ATP, pero sin la función bombeadora característica de un transportador activo (Recuadro 11-2).

Un transportador ABC humano con una especificidad de sustrato muy amplia es el **transportador multifármacos (MDR1)**, codificado por el gen *ABCB1*. MDR1 de la membrana de la placenta y de la barrera hematoencefálica expulsa compuestos tóxicos que dañarían el feto o el cerebro. Pero es también responsable de la sorprendente resistencia de ciertos tumores a algunos medicamentos antitumorales generalmente efectivos. Por ejemplo, MDR1 bombea fuera de las células los medicamentos quimioterápicos doxorrubicina y vinblastina, impidiendo así su acumulación dentro de un tumor con lo que bloquea sus efectos terapéuticos. La sobreexpresión de MDR1 está asociada, a menudo, con el fracaso en el tratamiento de cánceres de hígado, riñón y colon. Un transportador ABC relacionado, BCRP (del inglés *b*reast *c*ancer *r*esistance *p*rotein codificada por el gen *ABCG2*), se sobreexpresa en células del cáncer de mama, confiriendo también resistencia a los medicamentos anticancerosos. Se esperan inhibidores selectivos muy poderosos de estos transportadores multifármaco para incrementar la efectividad de los medicamentos antitumorales. Son, por tanto, objeto de búsqueda y diseño de medicamentos en la actualidad.

Los transportadores ABC también se hallan presentes en animales más sencillos y en plantas y microorganismos. La levadura tiene 31 genes que codifican transportadores ABC, *Drosophila* tiene 56, *E. coli* 80 lo que representa el 2% de su genoma completo. Se supone que transportadores ABC utilizados por *E. coli* y otras bacterias para importar sustancias esenciales tales como la vitamina B_{12} son los supuestos precursores evolutivos de los MDR de células animales. La presencia de transportadores ABC que confieren resistencia a antibióticos en microbios patógenos (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Neisseria gonorrhoeae* y *Plasmodium falciparum*) constituye una preocupación seria de salud pública al tiempo que convierte a estos transportadores en dianas atractivas en el diseño de medicamentos.

Los gradientes de iones proporcionan la energía para el transporte activo secundario

Los gradientes de iones formados por el transporte primario de Na^+ o H^+ pueden, a su vez, proporcionar la fuerza impulsora para el cotransporte de otros solutos. Muchos tipos de células contienen sistemas de transporte que acoplan el flujo espontáneo cuesta abajo de estos iones con el bombeo simultáneo cuesta arriba de otro ión, azúcar o aminoácido (Tabla 11-5).

TABLA 11-5 Sistemas de cotransporte impulsados por gradientes de Na^+ o H^+

Organismo/ tejido/tipo celular	Soluto transportado (contra gradiente)	Soluto cotransportado (a favor de gradiente)	Tipo de transporte
E. coli	Lactosa	H^+	Paralelo
	Prolina	H^+	Paralelo
	Ácidos dicarboxílicos	H^+	Paralelo
Intestino, riñón (vertebrados)	Glucosa	Na^+	Paralelo
	Aminoácidos	Na^+	Paralelo
Células de vertebrados (muchos tipos)	Ca^{2+}	Na^+	Antiparalelo
Plantas superiores	K^+	H^+	Antiparalelo
Hongos (*Neurospora*)	K^+	H^+	Antiparalelo

RECUADRO 11-2 MEDICINA Un canal iónico defectuoso en la fibrosis quística

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad hereditaria grave. En los Estados Unidos, la frecuencia de CF va desde 1 en 3.200 nacidos vivos entre blancosd y 1 entre 31.000 nacidos vivos entre los asiáticos americanos. Cerca de un 5% de los americanos blancos son portadores, al tener una copia defectuosa del gen y otra normal. Sólo los individuos con dos copias defectuosas muestran los síntomas graves de la enfermedad: obstrucción de los tractos gastrointestinal y respiratorio, que conduce normalmente a una infección bacteriana en los conductos aéreos.

El gen defectuoso en los pacientes de CF se descubrió en 1989. Codifica una proteína de membrana llamada regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, o CFTR (*c*ystic *f*ibrosis *t*ransmembrane conductance *r*egulator). Esta proteína tiene dos segmentos, cada uno de los cuales contiene seis hélices transmembrana, dos dominios de unión de nucleótidos (NBD) y una región reguladora que los conecta (Fig. 1). El CFTR es, por consiguiente, muy parecido a otras proteínas transportadoras ABC excepto que funciona como un *canal iónico* específico (para iones Cl^-) y no como bomba. El canal conduce Cl^- a través de la membrana plasmática cuando los



FIGURA 2 La mucosidad que recubre la superficie de los pulmones atrapa bacterias. En pulmones sanos (mostrados aquí), esas bacterias son exterminadas y barridas por la acción de los cilios. En la CF, este mecanismo está deteriorado, provocando infecciones recurrentes y daño progresivo a los pulmones. [Fuente: Tom Moninger, University of Iowa, Iowa City.]

dos NBD tienen ATP unido y se cierra cuando el ATP de uno de los NBD es degradado a ADP y P_i. El canal de Cl^- también es regulado por fosforilación de varios residuos Ser del dominio regulador, catalizada por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Capítulo 12).

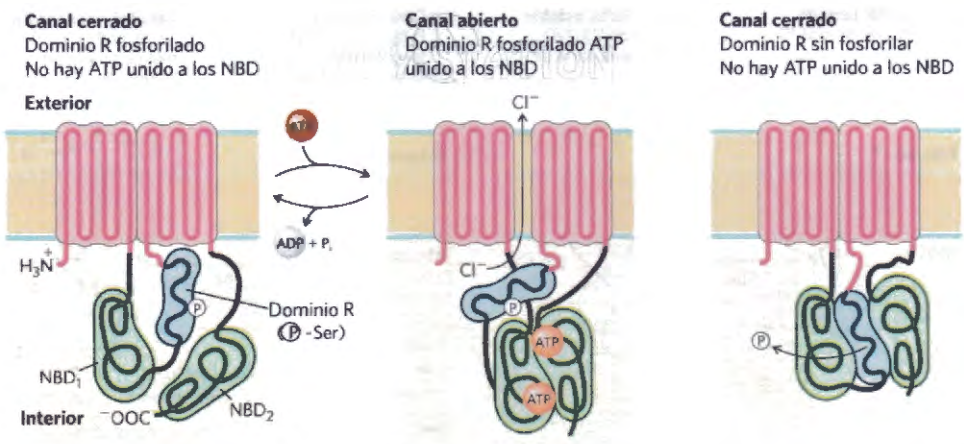


FIGURA 1 Tres estados de la proteína CFTR. La proteína tiene dos segmentos, cada uno con seis hélices transmembrana, y tres dominios funcionalmente significativos que se extienden desde la cara citoplasmática: NBD_1 y NBD_2 (verde) son dominios que unen nucleótidos a los que se une el ATP, mientras que un dominio regulador (azul) es el sito de la fosforilación por una proteína quinasa dependiente de cAMP. Cuando este dominio R está fosforilado pero no se ha unido ATP a los NBD (izquierda), el canal está cerrado. La unión de ATP abre el canal (centro) hasta que se hidroliza el ATP unido. Cuando el dominio R no está fosforilado (derecha), une los dominios NBD e impide la fijación de ATP y la apertura del canal. CFTR es un transportador ABC típico en todos los aspectos menos en dos: la mayoría de transportadores ABC carecen de dominio regulador y el CFTR actúa como un canal iónico (de Cl^-), a diferencia de un transportador típico.

El **transportador de lactosa (lactosa permeasa)** de *E. coli* constituye el prototipo bien conocido de cotransportador impulsado por protones. Esta proteína consiste en una sola cadena polipeptídica (417 residuos) que funciona en forma de monómero para transportar un protón y una molécula de lactosa al interior de la célula con acumulación neta de lactosa **(Fig. 11-39)**. *E. coli* produce normalmente un gradiente de protones y carga a través de su membrana plasmática gracias a la oxidación de combustibles y a la utilización de la energía de oxidación para bombear protones al exterior. (Este mecanismo se describe en detalle en el Capítulo 19). La membrana plasmática es impermeable a los protones, pero el transportador de lactosa proporciona una ruta para la reentrada de protones y la lactosa se transporta simultáneamente al interior de la célula por el cotransporte paralelo (symport). La acumulación endergónica de lactosa se acopla de este modo al flujo

RECUADRO 11-2 MEDICINA Un canal iónico defectuoso en la fibrosis quística

Cuando el dominio regulador no está fosforilado, se cierra el canal de Cl.

La mutación responsable de la CF es, en el 70% de los casos, una deleción de un residuo Phe en la posición 508 (mutación conocida como F508del). La proteína mutante no se pliega correctamente lo que interfiere con su inserción en la membrana plasmática con la consecuencia de que se reduce el transporte de Cl^- y H_2O a través de la membrana plasmática de las células epiteliales que revisten los conductos aéreos, el tracto digestivo, y las glándulas exocrinas (páncreas, glándulas sudoríparas), conductos biliares y conductos deferentes. Mutaciones menos frecuentes, tales como G551D (Gly^{551} cambiada a Asp), llevan a la producción de CFTR que está plegado e inserido correctamente en la membrana pero que es defectuoso en la transferencia de Cl^-.

El descenso en la exportación de Cl^- en individuos con CF va acompañado de una exportación menor de agua de las células con lo que la mucosidad presente en sus superficies celulares se deshidrata, volviéndose espeso y excesivamente pegajoso. En circunstancias normales, los cilios de las células epiteliales que recubren la cara interna del pulmón barren constantemente las bacterias que se depositan en esta mucosidad (Fig. 2), pero el moco espeso de los individuos que sufren CF impide este proceso, proporcionando un refugio en los pulmones para estas bacterias patógenas . El resultado son infecciones frecuentes por bacterias tales como *S.aureus* y *P.aeruginosa* que dañan progresivamente los pulmones y reducen la eficacia respiratoria resultando finalmente en muerte debido a un funcionamiento inadecuado del pulmón.

Los avances terapéuticos han aumentado la esperanza de vida de las personas con CF desde solo unos 10 años en 1960 hasta casi 40 años en la actualidad. Los potenciadores de CFTR tales como el ivacaftor (VX-770) aumentan la función de la proteína mutante G551D que está plegada adecuadamente y en su localización correcta en la membrana plasmática. En el caso de individuos con el defecto de plegamiento, F508del, los correctores de CFTR mejoran la maduración y llegada de la proteína mutante a su destino en la superficie celular; en estos pacientes, la combinación de fármacos potenciadores y correctores es más efectiva que el fármaco corrector solo (Fig. 3).

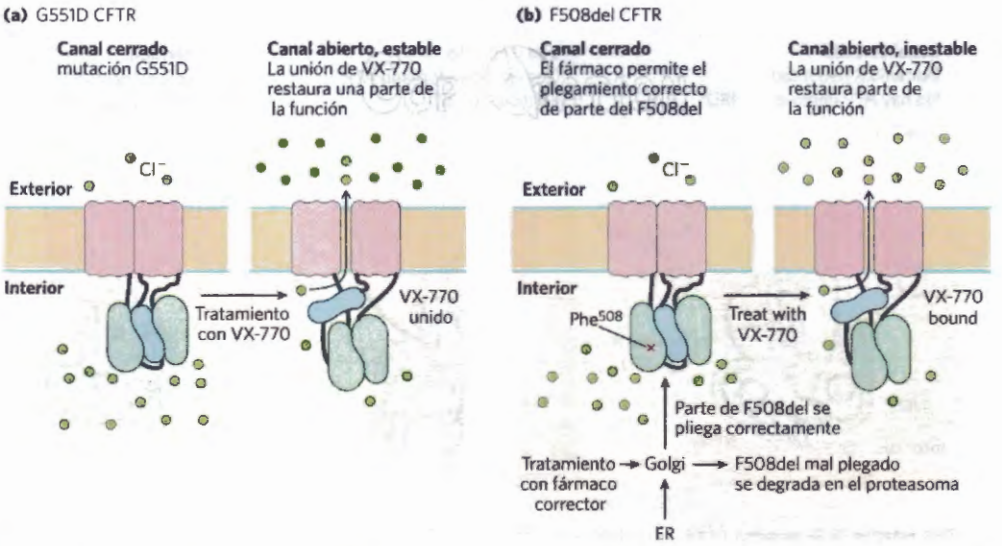


FIGURA 3 **(a)** La mutación G551D (sustitución de Gly^{551} por Asp) de CFTR da lugar a una proteína que se inserta correctamente en la membrana pero que es defectuosa como canal de Cl^-. La adición del fármaco potenciador VX-770 (ivacaftor) restaura parcialmente la función del canal de Cl^-. **(b)** La mutación más frecuente F508del (eliminación de Phe^{508}) impide el plegamiento correcto de CFTR lo que hace que sea degradado en los proteasomas. En presencia de un fármaco corrector, puede tener lugar el plegamiento y la inserción en la membrana; la adición del fármaco potenciador da lugar a una restauración parcial de la actividad canal de Cl^-. El canal es inestable y se degrada al cabo de un tiempo. [Fuente: Información de J. P. Clancy, *Sci. Transl. Med.* 6:1, 2014].

exergónico de protones al interior de la célula con una variación global de energía libre negativa.

El transportador de lactosa es un miembro de la **superfamilia facilitadora principal (major facilitator superfamily, MFS)** de transportadores que comprende 28 familias. Casi todas las proteínas de esta superfamilia tienen 12 dominios transmembrana (las pocas excepciones tienen 14). Las proteínas comparten relativamente poca homología de secuencia, pero la similitud de sus estructuras secundarias y la topología sugieren que tienen una estructura terciaria común. La resolución cristalográfica del transportador de lactosa de *E. coli* permite entrever esta estructura general **(Fig. 11-40a)**. Las 12 hélices transmembrana de la proteína están conectadas por bucles que sobresalen hacia el citoplasma o el espacio periplasmático (entre la membrana

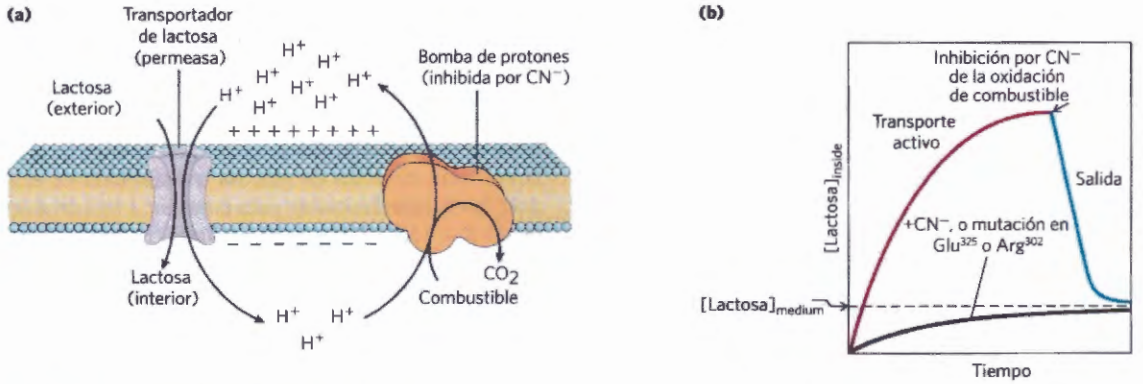


FIGURA 11-39 Captación de lactosa en *E. coli*. **(a)** El transporte primario de H^+ fuera de la célula, impulsado por la oxidación de una multitud de combustibles, establece tanto un gradiente protónico como un potencial eléctrico (negativo en el interior) a través de la membrana. El transporte activo secundario de lactosa al interior de la célula precisa un cotransporte paralelo de H^+ y lactosa por el transportador de lactosa. La captación de lactosa contra su gradiente de concentración depende enteramente de este flujo de protones hacia el interior impulsado por el gradiente electroquímico. **(b)** Cuando se bloquean por cianuro (CN^-) las reacciones de oxidación generadoras de energía del metabolismo, el transportador de lactosa permite que se equilibren la lactosa a través de la membrana vía transporte pasivo. Mutaciones que afectan a Glu^{325} o Arg^{302} tienen el mismo efecto que el cianuro. La línea a trazos representa la concentración de lactosa en el medio circundante.

plasmática y la membrana exterior o pared celular). Las seis hélices amino-terminales y las seis carboxi-terminales forman dominios muy similares que dan lugar a una estructura con una simetría binaria aproximada. En la forma cristalizada de la proteína hay una gran cavidad acuosa que está expuesta en el lado citoplasmático de la membrana. El sitio de unión del sustrato se encuentra en esta cavidad, más o menos en el centro de la membrana. El lado del transportador que mira hacia fuera (la cara periplasmática) está fuertemente cerrada sin que haya un canal suficientemente grande para que entre la lactosa. El mecanismo propuesto para el paso transmembrana del sustrato (Fig. 11-40b) implica un movimiento oscilante entre los dos dominios, impulsado por la unión del sustrato y el movimiento de protones que exponen de forma alternada el dominio de unión de sustrato al citoplasma y al periplasma. Este modelo, es similar al que se muestra en la Figura 11-30 para GLUT1.

En células epiteliales del intestino, la glucosa y ciertos amino ácidos se acumulan por cotransporte paralelo con Na^+, a favor del gradiente de Na^+ establecido por la Na^+K^+ ATPasa de la membrana plasmática **(Fig. 11-41)**. La superficie apical de las células epiteliales del intestino (la superficie encarada a los contenidos del intestino) está recubierta con microvili, que son proyecciones largas y delgadas de la membrana plasmática que incrementan enormemente el área superficial expuesta al contenido del intestino. Los **cotransportadores paralelos de Na^+-glucosa** de la membrana plasmática apical captan glucosa del intestino en un proceso impulsado por el flujo cuesta abajo de Na^+:

$$2Na^+_{out} + glucosa_{out} \longrightarrow 2Na^+_{in} + glucosa_{in}$$

La energía requerida para este proceso proviene de dos fuentes: la mayor concentración de Na^+ fuera (potencial químico) y el potencial transmembrana (eléctrico), que es negativo en el interior y por lo tanto facilita la entrada de Na^+ hacia dentro. La fuerte tendencia termodinámica de Na^+ a desplazarse al interior de la célula proporciona la energía necesaria para el transporte de glucosa al interior de la célula, contra su gradiente de concentración. Al igual que en el caso de la lactosa permeasa, un gradiente iónico creado y mante-

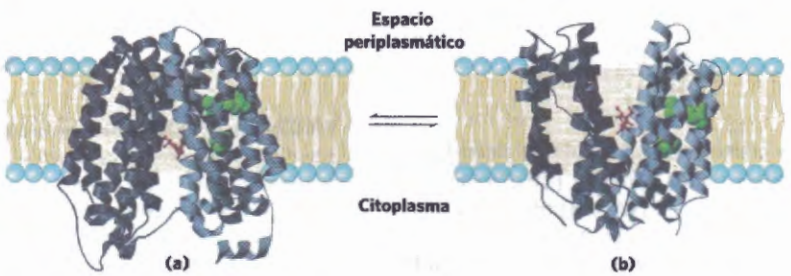


FIGURA 11-40 Transportador de lactosa (lactosa permeasa) de *E. coli*. **(a)** En la representación de cintas vista en paralelo al plano de la membrana se ven las 12 hélices transmembrana dispuestas en dos dominios casi simétricos que se muestran en diferentes tonos de púrpura. En la forma de la proteína para la que se determinó la estructura cristalina, el azúcar sustrato (rojo) está unido cerca del centro de la membrana estando expuesto al citosplasma. **(b)** La segunda conformación postulada del transportador, relacionada con la primera por un cambio conformacional grande y reversible en el que el sitio de unión del sustrato se expone primero al periplasma, en donde es captada la lactosa, y después al citoplasma en donde se libera la lactosa. La interconversión de las dos formas está impulsada por cambios en el apareamiento de cadenas laterales cargadas (que se pueden protonar) tales como las de Glu^{325} y Arg^{302} (verde) que están afectadas por el gradiente protónico transmembrana. [Fuentes: (a) Modificado de PDB ID 1PV7, J. Abramson et al., *Science* 301:610, 2003. (b) PDB ID 2CFQ, O. Mirza et al., *EMBO J.* 25:1177, 2006.]

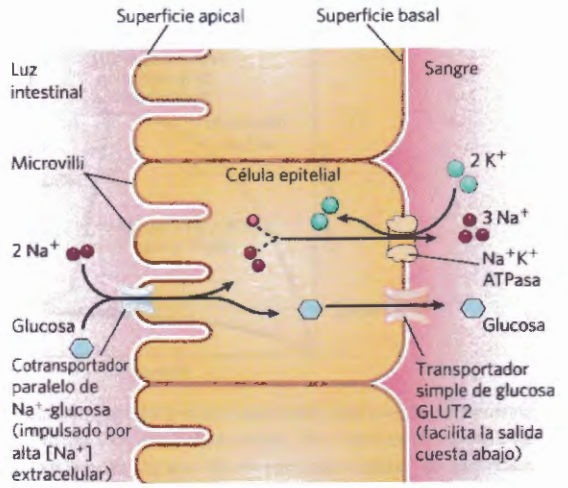


FIGURA 11-41 Transporte de glucosa en células del epitelio intestinal. La glucosa se cotransporta con Na^+ a través de la membrana plasmática apical al interior de la célula epitelial. Se desplaza a través de la célula hasta la superficie basal, donde pasa a la sangre vía GLUT2, un transportador pasivo simple de glucosa. La Na^+K^+ ATPasa continúa bombeando Na^+ hacia el exterior para mantener el gradiente de Na^+ que impulsa la captación de glucosa.

mido por un bombeo iónico dependiente de energía sirve como energía potencial para el cotransporte de otras especies contra su gradiente de concentración.

EJEMPLO RESUELTO 11-3 Energética del bombeo por un cotransportador paralelo

Calcule la razón máxima $\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$ que puede obtener el transportador paralelo de Na^+-glucosa de la membrana plasmática de una célula epitelial cuando la $[Na^+]_{in}$ es de 12 mM, la $[Na^+]_{out}$ de 145 mM, el potencial de membrana es de –50 mV (negativo en el interior) y la temperatura es de 37 °C.

Solución: Utilizando la ecuación 11-4, podemos calcular la energía inherente en un gradiente electroquímico de Na^+, es decir, el coste de transportar un ión Na^+ contra este gradiente:

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} + Z\mathcal{F}\Delta\psi$$

Sustituimos a continuación los valores estándar de R, T y $\mathcal{F}$ y los valores dados para $[Na^+]$ (expresados en concentraciones molares), +1 para Z (porque Na^+ tiene una carga positiva) y 0,050 V para $\Delta\psi$. Observe que el potencial de membrana es -50 mV (negativo en el interior), por lo que la variación de potencial cuando un ión se traslada desde el interior al exterior es de 50 mV.

$$\Delta G_t = (8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K}) \ln \frac{1{,}45 \times 10^{-1}}{1{,}2 \times 10^{-2}} + 1(96.500 \text{ J/V·mol})(0{,}050 \text{ V})$$

$$= 11{,}2 \text{ kJ/mol}$$

Cuando Na^+ vuelve a entrar en la célula, libera el potencial electroquímico creado al ser expulsado al exterior; ΔG para la reentrada es -11,2 kJ/mol de Na^+. Esta es la energía potencial por mol de Na^+ que está disponible para bombear glucosa. Dado que pasan dos iones Na^+ a favor de su gradiente electroquímico al interior de la célula por cada molécula de glucosa transportada en el simport, la energía disponible para bombear 1 mol de glucosa es de 2 x 11,2 kJ/mol = 22,4 kJ/mol. Podemos calcular ahora la razón de concentración de glucosa que puede conseguirse con esta bomba (de la ecuación 11-3, p. 413):

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}}$$

Reordenando, y sustituyendo los valores de ΔG_t, R y T, nos da

$$\ln \frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} = \frac{\Delta G_t}{RT} = \frac{22{,}4 \text{ kJ/mol}}{(8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K})} = 8{,}69$$

$$\frac{[\text{glucosa}]_{in}}{[\text{glucosa}]_{out}} = e^{8{,}69}$$

$$= 5{,}94 \times 10^3$$

Así, el cotransportador puede bombear glucosa hacia el interior hasta que su concentración dentro de las células epiteliales sea unas 6.000 veces la del exterior (en el intestino). (Esta es la razón teórica máxima, suponiendo un acoplamiento perfectamente eficiente de la reentrada de Na^+ con la captación de glucosa).

A medida que la glucosa se bombea desde el intestino a la célula epitelial en la superficie apical, se desplaza simultáneamente desde la célula hasta la sangre por transporte pasivo a través de un transportador de glucosa (GLUT2) de la superficie basal (Fig. 11-41). El papel crucial del Na^+ en los sistemas de cotransporte

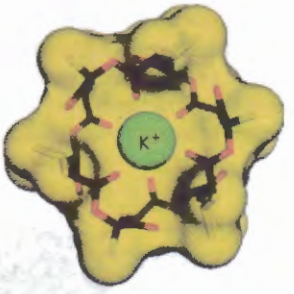


FIGURA 11-42 Valinomicina, un ionóforo peptídico que une K+. En esta imagen, los contornos de superficie se muestran como un cubierta transparente, a través de la cual son visibles una estructura en varillas del péptido y un ión K^+ (verde). Los átomos de oxígeno (rojo) que unen K^+ forman parte de una cavidad hidrofílica central. Cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos (amarillo) recubren el exterior de la molécula. Debido a que el exterior del complejo K^+-valinomicina es hidrofóbico, el complejo difunde fácilmente a través de membranas, transportando K^+ a favor de su gradiente de concentración. La disipación del gradiente iónico transmembrana resultante mata las células microbianas, por lo que la valinomicina es un potente antibiótico. [Fuente: Coordenadas preparadas para el Virtual Museum of Minerals and Molecules, http://virtual.museum.soils.wisc.edu/valinomycin/index.html, por Phillip Barak, University of Wisconsin-Madison, Department of Soil Science, utilizando datos de K. Neupert-Laves and M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* 58:432, 1975.]

paralelo y antiparalelo tal como el sistema descrito requiere el bombeo continuo de Na^+ hacia el exterior para mantener el gradiente de Na^+ transmembrana.

En el riñón, un cotransportador paralelo de Na^+-glucosa diferente es la diana de medicamentos utilizados para tratar la diabetes tipo 2. Las gliflozinas son inhibidores específicos de este cotransportador paralelo de Na^+-glucosa. Estos medicamentos disminuyen la glucosa sanguínea al inhibir la reabsorción de glucosa en el riñón, impidiendo de este modo los efectos dañinos de la concentración de glucosa sanguínea elevada. La glucosa no reabsorbida en el riñón se elimina con la orina.

Debido al papel esencial de los gradientes de iones en el transporte activo y en la conservación de la energía, los compuestos que colapsan los gradientes de iones a través de las membranas celulares son venenos eficaces mientras que aquéllos que son específicos para microorganismos infecciosos, pueden servir como antibióticos. Una de tales sustancias es la valinomicina, un péptido cíclico pequeño que neutraliza la carga del K^+ al rodearlo con seis oxígenos carbonílicos **(Fig. 11-42)**. El péptido hidrofóbico actúa entonces como lanzadera transportando el K^+ a través de la membrana a favor de su gradiente de concentración, destruyéndolo. Los compuestos que lanzan iones a través de membranas de esta forma se denominan **ionóforos,** ("portadores de iones"). Tanto la valinomicina como la monensina (un ionóforo transportador de Na^+) son antibióticos; matan células microbianas gracias a la destrucción de los procesos de transporte secundario y de las reacciones de conservación de la energía. La monensina es muy utilizada como agente antifúngico y antiparasitario. ■

Las acuaporinas forman canales transmembrana hidrofílicos para el paso de agua

Una familia de proteínas integrales de membrana descubierta por Peter Agre, las **acuaporinas (AQP),** proporcionan canales para el transporte rápido de moléculas de agua a través de todas las membranas plasmáticas. Las acuaporinas se encuentran en todos los organismos y, generalmente, se hallan presentes múltiples genes que codifican proteínas similares pero no idénticas. Se han descrito once acuaporinas en mamíferos, cada una de ellas con una localización y función específicas (Tabla 11-6). Los eritrocitos, que se hinchan o encogen rápidamente en respuesta a cambios bruscos en la osmolaridad extracelular cuando la sangre pasa a través de la médula renal, tienen una alta densidad de acuaporina en su membrana plasmática (2×10^5 moléculas de AQP1 por célula). Las glándulas exocrinas que producen sudor, saliva y lágrimas secretan agua a través de acuaporinas. En el nefrón (unidad funcional del riñón) siete tipos dife-



Peter Agre
[Fuente: Cortesía de Dr. Peter Agre, Johns Hopkins University.]

TABLA 11-6 Características de permeabilidad y distribución predominante de las acuaporinas de mamífero conocidas

Acuaporina	Permeante (permeabilidad)	Distribución tisular	Distribución subcelular*
AQP0	Agua (baja)	Cristalino	Membrana plasmática
AQP1	Agua (alta)	Eritrocito, riñón, pulmón, endotelio vascular, cerebro, ojo	Membrana plasmática
AQP2	Agua (alta)	Riñón, vas deferens	Membrana plasmática apical, vesículas intracelulares
AQP3	Agua (alta), glicerol (alta), urea (moderada)	Riñón, piel, pulmón, ojo, colon	Membrana plasmática basolateral
AQP4	Agua (alta)	Cerebro, músculo, riñón, pulmón, estómago, intestino delgado	Membrana plasmática basolateral
AQP5	Agua (alta)	Glándula salivar, glándula lacrimal, glándula sudorípara, pulmón, córnea	Membrana plasmática apical
AQP6	Agua (baja), aniones ($NO_3^- > Cl^-$)	Riñón	Vesículas intracelulares
AQP7	Agua (alta), glicerol (alta) urea (alta)	Tejido adiposo, riñón, testículo	Membrana plasmática
AQP8†	Agua (alta)	Testículo, riñón, hígado, páncreas, intestino delgado, colon	Membrana plasmática, vesículas intracelulares
AQP9	Agua (baja), glicerol (alta), urea (alta), arsenito	Hígado, leucocito, cerebro, testículo	Membrana plasmática
AQP10	Agua (baja), glicerol (alta), urea (alta)	Intestino delgado	Vesículas intracelulares

Fuente: Datos de L.S. King et al., *Nature Re. Mol. Cell Biol.* 5:688, 2004.

* La membrana plasmática apical se orienta hacia la luz de la glándula o tejido; la membrana plasmática basolateral se encuentra a lo largo de los lados y la base de la célula, no orientada hacia la luz de la glándula o tejido.

† AQP8 también podría ser permeada por urea.

rentes de acuaporinas intervienen en la producción de orina y en la retención de agua. Cada AQP renal tiene una localización específica en el nefrón y cada una de ellas tiene propiedades específicas y características reguladoras. Por ejemplo, la AQP2 de las células epiteliales del conducto colector renal está regulada por la vasopresina (también llamada hormona antidiurética): cuando el nivel de vasopresina es elevado se reabsorbe más agua en el riñón. Ratones mutantes que carecen del gen de la AQP2 presentan una mayor excreción de orina (poliuria) y una orina más diluida, resultado de la menor permeabilidad al agua del túbulo próximo. En la especie humana, se han descrito AQP genéticamente defectuosas que son responsables de distintas enfermedades entre las que se incluye una forma relativamente rara de diabetes que va acompañada de poliuria (Recuadro 11-1).

Las moléculas de agua atraviesan un canal de la AQP1 a una velocidad de aproximadamente 10^9 s^{-1}. En comparación, el número de recambio más alto conocido para un enzima es el de la catalasa, 4×10^7 s^{-1}, y muchos enzimas tienen un número de recambio entre 1 s^{-1} y 10^4 s^{-1} (véase la Tabla 6-7). La baja energía de activación para el paso del agua a través de los canales de acuaporina ($\Delta G^{\ddagger} < 15$ kJ/mol) sugiere que el agua se mueve a través de los canales en una corriente continua en la dirección dictada por el gradiente osmótico. (Para una discusión sobre la ósmosis, véase la p. 56). Las acuaporinas no permiten el paso de protones (iones hidronio, H_3O^+), que colapsarían los gradientes electroquímicos de las membranas. ¿Cuál es la base de esta extraordinaria selectividad?

Encontramos una respuesta en la estructura de AQP1, determinada por análisis de difracción de rayos X. La AQP1 **(Fig. 11-43a)** tiene cuatro monómeros idénticos (cada uno de M_r 28.000) y cada monómero forma un poro transmembrana con un diámetro suficiente para permitir el paso de moléculas de agua en fila india. Cada monómero tiene seis segmentos helicoidales transmembrana y dos hélices más cortas cada una de las cuales contiene la secuencia Asn-Pro-Ala (NPA). Las seis hélices transmembrana forman el poro a través del monómero y los dos bucles cortos que contienen NPA se extienden hacia el centro de la bicapa desde lados opuestos. Sus regiones NPA se solapan en el centro de la membrana para formar parte de la especificidad del filtro, la estructura que permite que sólo pase agua (Fig. 11-43b).

El canal de agua se estrecha hasta un diámetro de 2,8 Å cerca del centro de la membrana, lo que restringe severamente el tamaño de las moléculas que pueden viajar a través del canal. La carga positiva de un residuo Arg muy conservado en este cuello de botella impide el paso de cationes tales como H_3O^+. Los residuos que recubren el canal de cada monómero de AQP1 son, generalente, apolares, pero los oxígenos carbonílicos del esqueleto polipeptídico, que se proyectan hacia la parte estrecha del canal a intervalos, pueden formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua individuales cuando pasan a través del mismo; los dos residuos Asn (Asn^{76} y Asn^{192}) en los bucles NPA también forman puentes de hidrógeno con el agua. La estructura del canal no admite la formación de una cadena de moléculas de agua muy

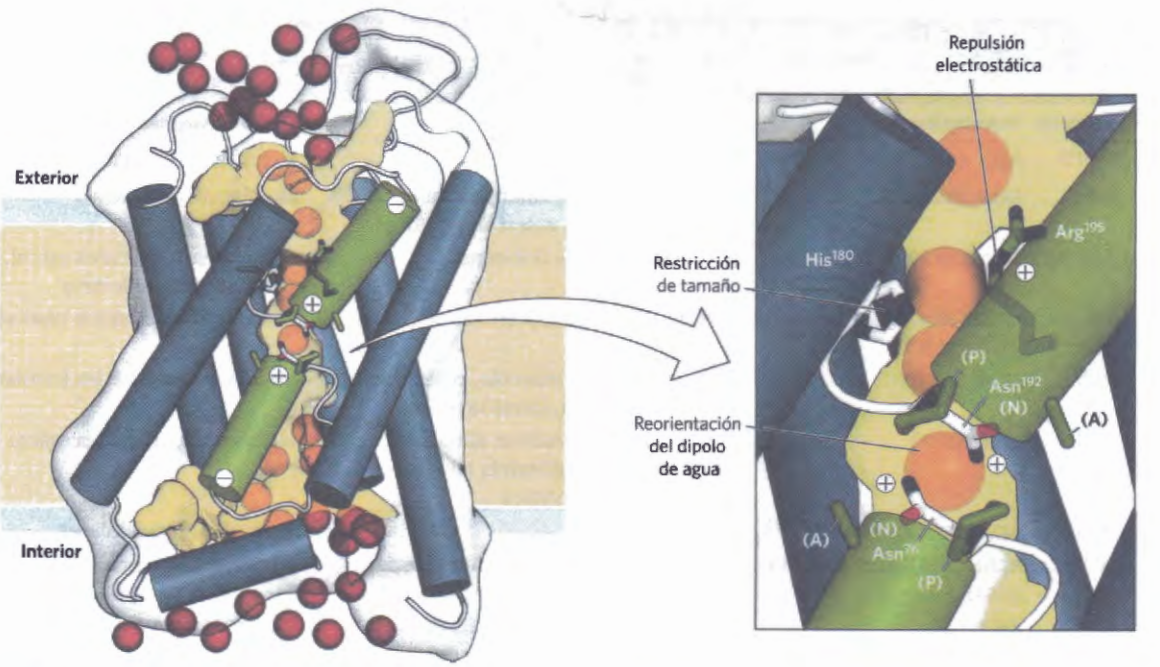


FIGURA 11-43 Acuaporina. La proteína es un tetrámero de subunidades idénticas, cada una de las cuales forma un poro transmembrana. **(a)** Un monómero de la acuaporina bovina vista desde el plano de la membrana. Las hélices forman un poro central (amarillo) a través del cual pasa el agua (rojo), y dos segmentos helicoidales cortos (verde). **(b)** Esta visión aumentada muestra que el poro se estrecha en His^{180} hasta un diámetro de 2,8 Å limitando el paso de moléculas de tamaño superior a la del H_2O. La carga positiva de Arg^{195} repele los cationes, incluido H_3O^+, e impide su paso a través del poro. Las dos hélices cortas mostradas en verde contienen las secuencias Asn-Pro-Ala (NPA) que se encuentran en todas las acuaporinas y que forman parte del canal de agua. Estas hélices están orientadas con sus dipolos cargados positivamente apuntando al poro de tal manera que fuerzan una molécula de agua a reorientarse a medida que pasa a través del poro. Esto rompe las cadenas de moléculas de agua unidas por puente de hidrógeno lo que impide el paso de protones por "salto de protones". [Fuentes: (a) Modificado de PDB ID 2B5F, S. Tornroth-Horsefiel et al., *Nature* 439:688, 2006. (b) Modificado de PDB ID 1J4N, H. Sui et al., *Nature* 414:872, 2001.]

cercanas unas de otras ya que ello permitiría el salto de protones (véase la Fig. 2-14), lo cual transportaría de manera efectiva protones a través de la membrana. Los residuos críticos de Arg e His y los dipolos eléctricos formados por las hélices cortas de los bucles NPA proporcionan cargas positivas en posiciones que repelen cualquier protón que se hubiera podido escapar a través del poro y también impiden la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua adyacentes.

Se ha descrito una acuoporina aislada de la espinaca con mecanismo de compuerta (abierta cuando dos residuos críticos de Ser cerca del extremo intracelular del canal están fosforilados y cerrada cuando están desfosforilados). Tanto la estructura abierta como la cerrada se han determinado por cristalografía. La fosforilación favorece una conformación que presiona dos residuos Leu y uno His cercanos hacia el canal, lo que bloquea el movimiento del agua después de este punto cerrando el canal de manera efectiva. Otras acuaporinas están reguladas de otras maneras que permiten cambios rápidos en la permeabilidad de la membrana al agua.

Aunque generalmente son muy específicas para el agua, algunas AQP también permiten que el glicerol o la urea pasen a altas velocidades (Tabla 11-6); se cree que estas AQP son importantes en el metabolismo del glicerol. Por ejemplo, la AQP7 que se encuentra en las membranas plasmáticas de los adipocitos (células grasas) transporta el glicerol de manera eficiente. Probablemente, esto es esencial en la importación de glicerol para la síntesis de triacilgliceroles y para su exportación durante la degradación de triacilgliceroles. Los ratones con AQP7 defectuosa desarrollan obesidad y diabetes no dependiente de insulina.

Los canales selectivos de iones permiten el movimiento rápido de iones a través de las membranas

Inicialmente reconocidos en neuronas mientras que ahora se sabe que están presentes en las membranas plasmáticas de todas las células, así como en las membranas intracelulares de los eucariotas, los **canales selectivos de iones** proporcionan otro mecanismo para transportar iones inorgánicos a través de las membranas. Los canales iónicos, junto con las bombas de iones tales como la Na^+K^+ ATPasa, determinan la permeabilidad de una membrana plasmática a iones específicos y regulan la concentración citosólica de iones así como el potencial de membrana. En las neuronas, cambios muy rápidos en la actividad de los canales iónicos provocan cambios en el potencial de membrana (los potenciales de acción) que transportan señales desde el extremo de una neurona a otra. En los miocitos, la apertura rápida de los canales de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático libera el Ca^{2+} que desencadena la contracción muscular. Discutiremos las funciones de señalización de los canales iónicos en el Capítulo 12. Aquí describiremos las bases estructurales de la función de los canales iónicos, usando como ejemplos un canal de K^+ bacteriano regulado por voltaje, el canal neuronal de Na^+ y el canal iónico del receptor de acetilcolina.

Los canales iónicos se distinguen de los transportadores de iones en al menos tres aspectos. Primero, la velocidad de flujo a través de los canales puede ser varios órdenes de magnitud mayores que el número de recambio de un transportador (10^7 a 10^8 iones/s para un canal iónico, cercano al máximo teórico para la difusión no restringida). El contraste con el número de recambio de la Na^+K^+ATPasa, de alrededor de 100^{s-1}, es altamente significativo. Segundo, los canales iónicos no se saturan; sus velocidades no se acercan a un máximo a una concentración de sustrato elevada. Tercero, son "compuertas", abiertas o cerradas en respuesta a algún proceso celular. En los **canales de compuerta regulada por ligando** (que son generalmente oligoméricos), la unión de una molécula extracelular o intracelular pequeña fuerza una transición alostérica de la proteína, que abre o cierra el canal. En los **canales iónicos de compuerta**

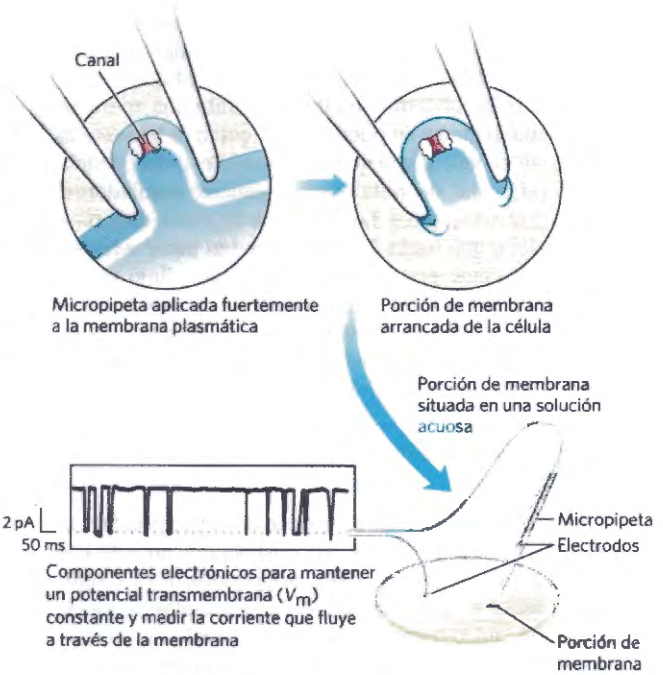


FIGURA 11-44 Mediciones eléctricas de la función de un canal iónico. La "actividad" de un canal iónico se determina midiendo el flujo de iones a través del mismo, usando la técnica de patch-clamp. Se presiona una micropipeta muy fina contra la superficie celular, y la presión negativa en la pipeta se usa para formar un sello de presión entre la pipeta y la membrana. Cuando la pipeta es retirada de la célula, arranca un pequeño trozo (patch) de membrana (que puede contener uno o pocos canales iónicos). Cuando la pipeta y el trozo adherido se sitúan en una solución acuosa, se puede medir la actividad del canal en función de la corriente eléctrica que fluye entre los contenidos de la pipeta y la solución acuosa. En la práctica, se crea un circuito que "sujeta" (clamps) el potencial transmembrana a un valor dado y mide la corriente que debe fluir para mantener este voltaje. Con detectores de corriente muy sensibles, se puede medir la corriente que fluye a través de un canal iónico individual que es, típicamente, de unos pocos picoamperios. La traza que muestra la corriente en función del tiempo (en milisegundos) revela la rapidez a la cual se abre y se cierra el canal, la frecuencia de apertura, y el tiempo que permanece abierto. La deflección hacia abajo representa la apertura del canal. "Sujetando" el V_m a diferentes valores se consigue la determinación del efecto del potencial de membrana sobre estos parámetros de la función del canal. [Fuente: V. Witzemann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 93:13286, 1996.]

regulada por voltaje, un dominio de una proteína cargada se mueve con relación a la membrana como respuesta a un cambio de potencial eléctrico transmembrana (V_m), abriendo o cerrando el canal. Los dos tipos de compuerta pueden ser muy rápidos. Un canal típico se abre en una fracción de milisegundo, y puede permanecer abierto sólo unos pocos milisegundos, haciendo que estos dispositivos moleculares sean efectivos para una transmisión muy rápida de señal en el sistema nervioso.

La función del canal iónico se mide eléctricamente

Debido a que un canal iónico sencillo normalmente se mantiene abierto solamente durante unos cuantos milisegundos, el seguimiento de este proceso está más allá del límite de la mayoría de las medidas bioquímicas. El flujo de iones tiene que ser medido por lo tanto eléctricamente, ya sea como cambios en V_m (en la zona de milivoltios) o como corrientes eléctricas I (en microamperios o picoamperios), utilizando microelectrodos y amplificadores adecuados. En el **patch-clamping**, una técnica desarrollada por Edwin Neher y Bert Sakmann en 1976, se miden corrientes muy pequeñas a través de una minúscula región de la superficie de la membrana que contiene sólo una o una pocas moléculas de canal iónico **(Fig. 11-44)**. Se pueden medir el tamaño y la duración de la corriente que fluye durante una apertura de un canal iónico y se puede medir con qué frecuencia se abre un canal y cómo queda afectada esta frecuencia por el potencial de membrana, ligandos reguladores, toxinas y otros agentes. Los estudios de patch-clamping han revelado que hasta 10^4 iones pueden pasar a través de un solo canal en un milisegundo. Este flujo iónico representa una enorme amplificación de la señal inicial; por ejemplo, sólo son necesarias dos moléculas de acetilcolina para abrir un canal receptor de acetilcolina (tal como se describe más adelante).



Erwin Neher
[Fuente: Cortesia de Boettcher -Gajewski/Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie.]



Bert Sakmann
[Fuente: Cortesía de Max Planck Institut für Neurobiologie.]

La estructura de un canal de K^+ muestra las bases de su especificidad

La estructura de un canal de potasio de la bacteria *Streptomyces lividans*, determinada cristalográficamente por Roderick MacKinnonn en 1998, proporciona mucha información sobre el funcionamiento de los canales de iones. Este canal iónico bacteriano está relacionado en secuencia con todos los demás canales de K^+ conocidos y sirve como prototipo de dichos canales, incluidos los canales neuronales de K^+ de compuerta regulada por voltaje. Entre los miembros de esta familia de proteínas, las similitudes de secuencia son máximas en la "región del poro" que contiene un filtro de selectividad de ión que permite el paso de K^+ (radio 1,33 Å) 10.000 veces más fácilmente que el Na^+ (radio 0,95 Å) a una velocidad (unos 10^8 iones/s) cercana al límite teórico de la difusión libre.

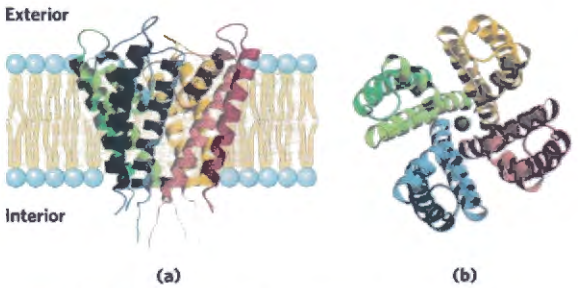


Roderick MacKinnon
[Fuente: Cortesía de Dr. Roderick MacKinnon, Laboratory of Molecular Neurobiology and Biophysics, The Rockefeller University.]

El canal de K^+ está formado por cuatro subunidades idénticas que abarcan la membrana y forman un cono dentro de un cono rodeando el canal iónico, con el extremo ancho del doble cono mirando hacia el espacio extracelular **(Fig. 11-45a)**. Cada subunidad tiene dos hélices α transmembrana y una tercera hélice más corta que contribuye a la región del poro. El cono externo está formado por una de las hélices transmembrana de cada subunidad. El cono interior, formado por las cuatro hélices transmembrana restantes, rodea el canal iónico y acuna el filtro de selectividad de ión. Visto perpendicular al plano de la membrana, se ve que el canal central es suficientemente ancho para acomodar un ión metálico no hidratado tal como el potasio (Fig. 11-45b)

Tanto la especificidad iónica como el alto flujo a través del canal son explicables a partir de lo que conocemos sobre la estructura del canal (Fig. 11-45c). En las superficies externa e interna de la membrana plasmática, los caminos de entrada al canal tienen varios residuos aminoácidos con cargas negativas que, presumiblemente, incrementan la concentración local de cationes tales como K^+ y Na^+. La ruta del ión a través de la membrana comienza (en la cara interna) como un canal ancho, relleno de agua en el que el ión puede mantener su esfera de hidratación. Se logra una mayor estabilización gracias a las hélices cortas en la región del poro de cada subunidad, con las cargas negativas parciales de sus dipolos eléctricos apuntando hacia el K^+ en el canal. Una vez pasados los dos tercios del camino a través de la membrana, este canal se estrecha en la región del filtro de selectividad obligando al ión a perder sus moléculas de agua de hidratación. Los átomos de oxígeno carbonílicos de la cadena principal del filtro de selectividad reemplazan las moléculas de agua de la esfera de hidratación, formando una serie de capas de coordinación perfectas a través de las cuales se mueve el K^+. Esta interacción favorable con el filtro no es posible para el Na^+, que es demasiado pequeño para establecer los contactos con todos los ligandos de oxígeno potenciales. La estabilización preferencial del K^+ es la base de la selectividad iónica del filtro por lo que mutaciones que cambian residuos en esta parte de la proteína eliminan la selectividad iónica del canal. Los sitios de unión de K^+ del filtro son suficientemente flexibles para colapsarse y encajar cualquier Na^+ que entre en el canal. Este cambio conformacional cierra el canal.

Existen cuatro sitios potenciales de fijación de K^+ a lo largo del filtro de selectividad, cada uno de ellos for-



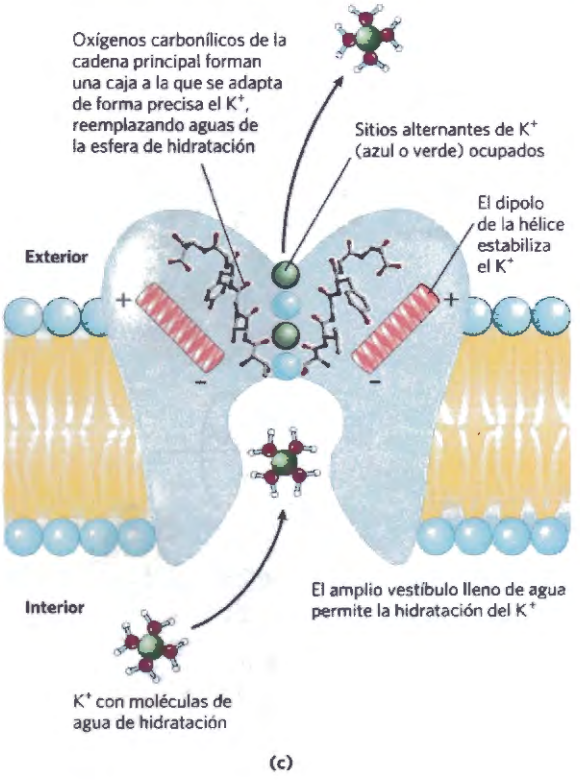


FIGURA 11-45 Canal de K^+ de *Streptomyces lividans*. **(a)** Visto en el plano de la membrana, el canal está formado por ocho hélices transmembrana (dos de cada una de las cuatro subunidades idénticas), formando un cono con su extremo ancho hacia el espacio extracelular. Las hélices internas del cono (de color más claro) revisten el canal transmembrana, mientras que las hélices externas interaccionan con la bicapa lipídica. Segmentos cortos de cada subunidad convergen en el extremo abierto del cono para formar un filtro selectivo. **(b)** Esta vista perpendicular al plano de la membrana muestra las cuatro subunidades dispuestas alrededor de un canal central lo suficientemente ancho como para que pase un único ión de K^+. **(c)** Diagrama de un canal de K^+ en sección transversal mostrando las características críticas para su función. Los oxígenos carbonílicos (rojo) del armazón peptídico en el filtro de selectividad sobresalen en el canal, interaccionando y estabilizando un ión K^+ que lo atraviesa. Estos ligandos están posicionados de manera perfecta para interaccionar con cada uno de los cuatro iones K^+ pero no con los iones Na^+ más pequeños. Esta interacción preferente con K^+ es la base de la selectividad iónica. [Fuentes: (a, b) PDB ID 1BL8, D. A. Doyle et al., *Science* 280 :69, 1998. (c) Información de G. Yellen, *Nature* 419 :35, 2002, y PDB ID 1J95, M. Zhou et al., *Nature* 411:657, 2001.]

mado por una "jaula" de oxígeno que proporciona ligandos para los iones K^+ (Fig. 11-45c). En la estructura cristalina son visibles dos iones K^+ dentro del filtro de selectividad, separados unos 7,5 Å, mientras que dos moléculas de agua se encuentran en las posiciones no ocupadas. Los iones K^+ pasan a través del filtro en fila india; muy probablemente sus repulsiones electrostáticas mutuas equilibran la interacción de cada ión con el filtro de selectividad manteniéndolos en movimiento. El desplazamiento de los dos iones K^+ es concertado: en primer lugar ocupan las posiciones 1 y 3, saltando después a las posiciones 2 y 4. La diferencia energética entre estas dos configuraciones (1, 3 y 2, 4) es muy pequeña; energéticamente, el poro de selectividad no es un conjunto de colinas y valles sino una superficie plana que es ideal para el desplazamiento rápido de iones a través del canal. Parece que la estructura del canal se ha optimizado durante la evolución para dar velocidades de flujo máximas y alta especificidad.

Los canales de K^+ con regulación de compuerta por voltaje son estructuras más complejas que la que se muestra en la Figura 11-45, si bien constituyen variaciones sobre el mismo tema. Por ejemplo, en los mamíferos los canales de K^+ con regulación de compuerta por voltaje de la familia *Shaker* tienen un canal iónico como el del canal bacteriano que se muestra en la Figura 11-45, pero con dominios proteicos adicionales que actúan como sensores del potencial de membrana, se mueven en respuesta a un cambio de potencial y, al moverse, desencadenan la apertura o cierre del canal de K^+ **(Fig. 11-46)**. La hélice transmembrana crítica en el dominio sensor del voltaje de los canales de K^+ *Shaker* contiene cuatro residuos Arg; las cargas positivas de estos residuos hacen que la hélice se desplace en relación a la membrana como respuesta a cambios en el campo eléctrico transmembrana (el potencial de membrana).

Las células también tienen canales que conducen específicamente Na^+ o Ca^{2+} mientras que excluyen el K^+. En cada caso, la capacidad de discriminación entre cationes requiere tanto una cavidad en el sitio de unión del tamaño justo (ni demasiado grande ni demasiado pequeña) para acomodar el ión así como la colocación precisa dentro de la cavidad de los oxígenos carbonílicos que puedan reemplazar la capa de hidratación del ión. Este encaje se puede conseguir con moléculas de menor tamaño que las proteínas; por ejemplo, la valinomicina (Fig. 11-42) puede proporcionar el encaje preciso que confiere elevada especificidad para la unión de un ión y no de otro. Los químicos han diseñado moléculas con una especificidad muy elevada para la unión de Li^+ (radio 0,60 Å), Na^+ (radio 0,95 Å), K^+ (radio 1,33 Å) o Rb^+ (radio 1,48 Å). No obstante, las versiones biológicas (los canales proteicos) no sólo *fijan* específicamente sino que *conducen* los iones a través de las membranas mediante un mecanismo de *compuerta*.

Los canales iónicos de compuerta son básicos en la función neuronal

Prácticamente en toda señalización rápida entre las neuronas y sus tejidos diana (como, por ejemplo, el músculo) interviene la apertura y cierre rápidos de canales iónicos de la membrana plasmática. Por ejemplo, los canales de Na^+ de la membrana plasmática de las neuronas detectan el gradiente eléctrico transmembrana y responden a cambios con la apertura y el cierre. Estos canales iónicos de compuerta por voltaje son, típicamente, muy selectivos para Na^+ por encima de otros cationes monovalentes o divalentes (con factores de 100 o más)

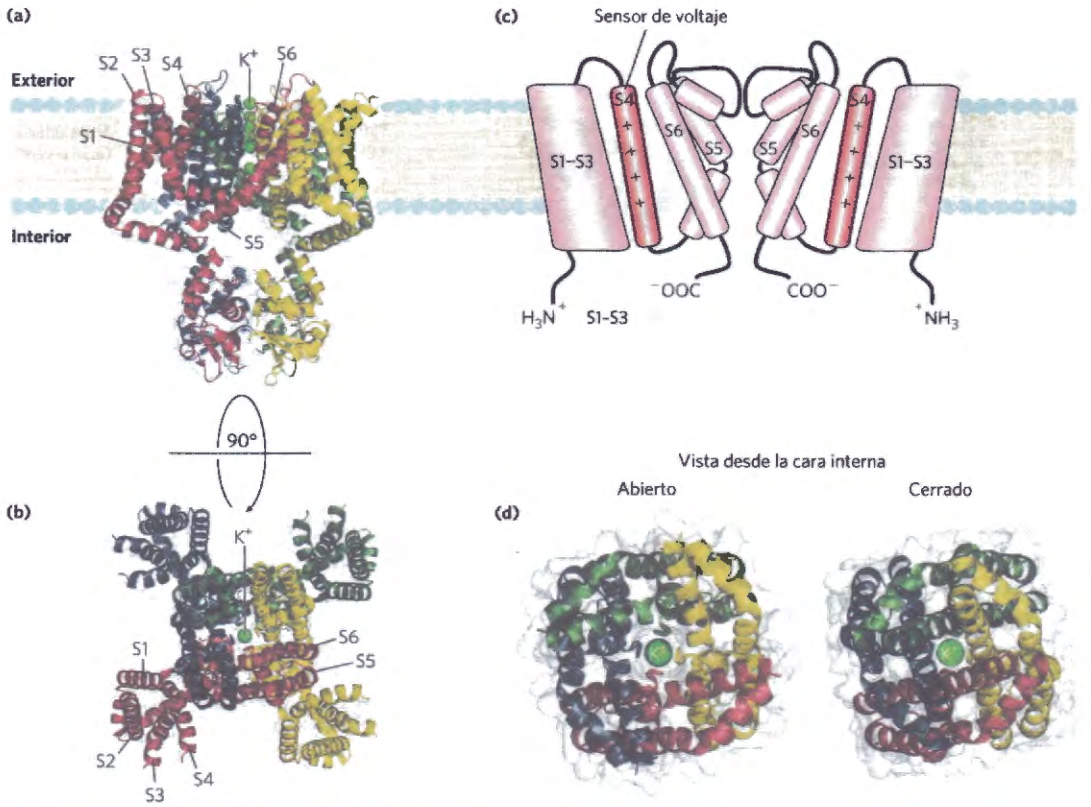
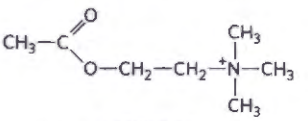


FIGURA 11-46 Bases estructurales del mecanismo de compuerta regulada por voltaje en un canal de K+ de la familia *Shaker*. Esta estructura cristalina del complejo Kv1.2-subunidad $\beta 2$ de cerebro de rata muestra el canal básico de K^+ (correspondiente al mostrado en la Fig. 11-45) con la maquinaria extra necesaria para que el canal sea sensible a la compuerta por potencial de membrana: cuatro extensiones helicoidales transmembrana de cada subunidad y cuatro subunidades β. El complejo entero, visto **(a)** en el plano de la membrana y **(b)** perpendicular al plano de la membrana (tal como se ve desde el exterior de la membrana) se representa como en la Fig. 11-45, con cada subunidad de un color diferente; cada una de las cuatro subunidades β se colorea igual que la subunidad con la que se asocia. En (b) cada hélice transmembrana de una subunidad (rojo) se numera S1 hasta S6. S5 y S6 de cada una de las cuatro subunidades forma el propio canal y son comparables a las dos hélices transmembrana de cada subunidad en la Figura 11-45. S1 a S4 son cuatro hélices transmembrana. La hélice S4 contiene los residuos de Arg altamente conservados y se cree que consituye la parte móvil principal del mecanismo de percepción del voltaje. **(c)** Diagrama esquemático del canal regulado por voltaje que muestra la estructura básica del poro (centro) y las estructuras extra que permiten que el canal sea sensible al voltaje; S4, la hélice que contiene Arg, está en naranja. Para mayor claridad en esta vista no se muestran las subunidades β. En la membrana en reposo, el potencial eléctrico transmembrana (negativo en el interior) estira las cadenas laterales cargadas positivamente de las Arg en S4 hacia el lado citosólico. Cuando la membrana está despolarizada la atracción disminuye y con la inversión completa del potencial de membrana, S4 es llevada hacia el lado extracelular. **(d)** Este movimiento de S4 está acoplado físicamente a la apertura y cierre del canal de K^+, que se muestra aquí en sus conformaciones abierta y cerrada. Aunque el K^+ está presente en el canal cerrado, el poro se cierra en la parte inferior, cerca del citosol, impidiendo el paso de K^+. [Fuentes: (a, b, d) PDB ID 2A79, S. B. Long et al., *Science* 309:897, 2005. (c) Información de C. S. Gandhi and E. Y. Isacoff, *Trends Neurosci.* 28:472, 2005.]

y tienen una velocidad de flujo muy alta ($>10^7$ iones/s). Cerrados en estado de reposo, los canales de Na^+ se abren (activan) por una reducción del potencial de membrana. En cuestión de milisegundos después de la apertura, el canal se cierra y permanece inactivo durante muchos milisegundos. La activación seguida de la inactivación de los canales de Na^+ es la base de la señalización por las neuronas (véase la Fig. 12-29).

Otro canal iónico muy bien estudiado es el **receptor nicotínico de acetilcolina**, que interviene en el paso de una señal eléctrica desde una neurona motora a una fibra muscular en la unión neuromuscular (señala al músculo para que se contraiga). La acetilcolina liberada por la neurona motora difunde unos pocos micrómetros hacia la membrana plasmática de un miocito, donde se une al receptor de acetilcolina. Esto obliga a un cambio de conformación en el receptor, provocando la apertura de su canal iónico. El movimiento resultante de las cargas positivas hacia el interior del miocito despolariza su membrana plasmática desencadenando la contracción. El receptor de acetilcolina permite que Na^+, Ca^{2+} y K^+ pasen con igual facilidad a través de su canal, pero no pueden pasar otros cationes y ningún anión. El movimiento de Na^+ a través del canal iónico del receptor de acetilcolina es insaturable (su velocidad es lineal con respecto a la concentración extracelular de Na^+) y muy rápida, cerca de $2x10^7$ iones/s en condiciones fisiológicas.



Acetilcolina

TABLA 11-7 Sistemas de transporte descritos en otras partes de este libro

Sistema de transporte y localización	Figura	Función
Canal de Ca^{2+} regulado por IP_3 del RE	12-11	Permite la señalización mediante cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+}
Transportador de glucosa de la membrana plasmática de células animales; regulado por insulina	12-20	Aumenta la capacidad del músculo y del tejido adiposo para captar exceso de glucosa de la sangre
Canal de Na^+ con compuerta regulada por voltaje de la neurona	12-29	Crea potenciales de acción en la transmisión de la señal neuronal
Transportador de ácidos grasos de la membrana plasmática del miocito	17-3	Importa ácidos grasos para ser utilizados como combustible
Transportador de acil-carnitina/carnitina de la membrana mitocondrial interna	17-6	Importa ácidos grasos a la matriz para la β-oxidación
Complejos I, III y IV, transportadores de protones de la membrana mitocondrial interna	19-16	Actúa como mecanismo conservador de la energía en la fosforilación oxidativa, convirtiendo el flujo electrónico en un gradiente de protones
ATPasa F_0F_1/ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, tilacoide del cloroplasto y membrana plasmática bacteriana	19-25, 20-20a, 20-24	Interconvierte la energía del gradiente de protones y del ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación
Cotransportador antiparalelo de nucleótidos de adenina de la membrana mitocondrial interna	19-30	Importa el sustrato ADP para la fosforilación oxidativa y exporta el producto ATP
Cotransportador paralelo P_i-H^+ de la membrana mitocondrial interna	19-30	Suministra P_i para la fosforilación oxidativa
Transportador de malato-α-cetoglutarato de la membrana mitocondrial interna	19-31	Lanza equivalentes de reducción (en forma de malato) desde la matriz al citosol
Transportador de glutamato-aspartato de la membrana mitocondrial interna	19-31	Completa la acción iniciada por la lanzadera de malato-α-cetoglutarato
Proteína desacopladora UCP1, un poro protónico de la membrana mitocondrial interna	19-36, 23-35	Permite la disipación del gradiente protónico de la mitocondria como medio de termogénesis y/o eliminación de exceso de combustible
Complejo citocromo *bf*, transportador de protones del tilacoide del cloroplasto	20-19	Actúa como bomba de protones, impulsada por el flujo electrónico a través del esquema en Z; fuente de un gradiente de protones para la formación fotosintética de ATP
Bacteriorrodopsina, bomba de protones impulsada por la luz	20-27	Es la fuente del gradiente de protones impulsado por la luz para la síntesis de ATP en la bacteria halófila
Cotransportador antiparalelo P_i-triosa fosfato de la membrana interna del cloroplasto	20-42, 20-43	Exporta productos fotosintéticos desde el estroma; importa P_i para la síntesis de ATP
Transportador de citrato de la membrana mitocondrial interna	21-10	Proporciona citrato al citosol como fuente de acetil-CoA para la síntesis de lípidos
Transportador de piruvato de la membrana mitocondrial interna	21-10	Forma parte del mecanismo de la lanzadera de citrato desde la matriz al citosol
Receptor de LDL en la membrana plasmática de células animales	21-41	Importa, mediante endocitosis facilitada por receptor, partículas transportadoras de lípidos
Proteína translocasa del RE	27-40	Transporta proteínas al RE destinadas a la membrana plasmática, a la secreción o a orgánulos
Proteína translocasa del poro nuclear	27-44a	Lanzadera de proteínas entre el núcleo y el citoplasma
Transportador proteico bacteriano	27-46	Exporta proteínas secretadas a través de la membrana plasmática

El canal del receptor de acetilcolina es característico de otros muchos canales iónicos que producen o responden a señales eléctricas: tiene una "compuerta" que se abre en respuesta a la estimulación por una molécula señal (en este caso acetilcolina) y un mecanismo intrínseco de temporización que cierra la compuerta al cabo de un instante. Así la señal de acetilcolina es transitoria lo que es una característica esencial de la conducción de señales eléctricas.

Basándose en similitudes entre las secuencias de aminoácidos de otros canales iónicos de compuerta regulada por ligando y el receptor de acetilcolina, los canales receptores neuronales que responden a las señales extracelulares ácido γ-aminobutírico (GABA), glicina y serotonina se han agrupado en la superfamilia del receptor de acetilcolina; todos ellos comparten probablemente la estructura tridimensional y los mecanismos de compuerta. Los receptores $GABA_A$ y de glicina son canales aniónicos específicos para Cl^- o HCO_3^- mientras que el receptor de serotonina, al igual que el receptor de acetilcolina, es específico para cationes.

Otra clase de canales iónicos de compuerta regulada por ligando responde a ligandos *intracelulares*: guanosina 3′,5′ mononucleótido cíclico (cGMP) en el ojo de vertebrados, cGMP y cAMP en neuronas olfativas, y ATP e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) en muchos tipos celulares. Estos canales están compuestos por múltiples subunidades que contienen cada una seis dominios helicoidales transmembrana. Describiremos las funciones de señalización de estos canales iónicos en el Capítulo 12.

En la Tabla 11-7 se muestran algunos transportadores descritos en otros capítulos en el contexto de las rutas en las que actúan.

Canales iónicos defectuosos pueden tener consecuencias fisiológicas graves

La importancia de los canales iónicos en los procesos fisiológicos está clara a partir de los efectos de mutaciones en proteínas de canales iónicos específicos (Tabla 11-8, Recuadro 11-2). Los defectos genéticos en el canal de Na^+ de compuerta regulada por voltaje de la membrana plasmática del miocito conducen a enfermedades en las que los músculos periódicamente se paralizan (tal como sucede en la parálisis periódica hipercaliémica) o se vuelven rígidos (como en la paramiotonía congénita). La fibrosis quística es el resultado de una mutación que modifica un aminoácido en la proteína CFTR, un canal de iones Cl^-; el proceso defectuoso aquí no es la neurotransmisión, sino la secreción por varias células glandulares exocrinas cuyas actividades están ligadas a los flujos de ión Cl^-.

Muchas toxinas presentes en la naturaleza actúan sobre canales iónicos, y la potencia de estas toxinas ilustra aun más la importancia del funcionamiento normal de los canales iónicos. La tetrodoxina (producida por el pez soplador, *Spheroides rubripes*) y la saxitoxina (producida por el dinoflagelado marino *Gonyaulax*, causante de las "mareas rojas") actúan uniéndose a los canales de Na^+ de compuerta regulada por voltaje de las neuronas impidiendo de este modo los potenciales de acción normales. El pez soplador es un ingrediente de la exquisitez japonesa fugu, que sólo puede ser preparada por chefs entrenados especialmente para separar tan suculento bocado del veneno mortal. Comer marisco que se haya alimentado de *Gonyaulax* puede ser también fatal; el marisco no es sensible a la saxitoxina, pero la concentran en sus músculos, que pasan a ser altamente venenosos para organismos situados más arriba en la cadena alimentaria. El veneno de la serpiente mamba negra contiene dendrotoxina, que interfiere con canales de K^+ de entrada regulada por voltaje. La tubocurarina, componente activo del curare (usado como veneno para flechas en el Amazonas) y otras dos toxinas de venenos de serpiente, cobrotoxina y bungarotoxina bloquean el receptor de acetilcolina o impiden la abertura de su canal iónico. Al bloquear señales desde los nervios a los músculos, todas estas toxinas provocan parálisis y posiblemente la muerte. En el lado positivo, la extremadamente elevada afinidad de la bungarotoxina para el receptor de la acetilcolina ($K_d = 10^{-15}$ M) ha

TABLA 11-8 Algunas enfermedades debidas a canales iónicos defectuosos

Canal iónico	Gen afectado	Enfermedad
Na^+ (compuerta por voltaje, músculo esquelético)	*SCN4A*	Parálisis periódica hipercaliémica (o paramiotonía congénita)
Na^+ (compuerta por voltaje, neuronal)	*SCN1A*	Epilepsia generalizada con ataques febriles
Na^+ (compuerta por voltaje, músculo cardíaco)	*SCN5A*	Síndrome 3 de largo QT
Ca^{2+} (neuronal)	*CACNA1A*	Migraña hemipléjica familiar
Ca^{2+} (compuerta por voltaje, retina)	*CACNA1F*	Ceguera nocturna estacionaria congénita
Ca^{2+} (policistina-1)	*PKD1*	Enfermedad renal poliquística
K^+ (neuronal)	*KCNQ4*	Sordera dominante
K^+ (compuerta por voltaje, neuronal)	*KCNQ2*	Convulsiones neonatales familiares benignas
Catión inespecífico (regulado por cGMP, retinal)	*CNCG1*	Retinitis pigmentosa
Receptor de acetilcolina (músculo esquelético)	*CHRNA1*	Síndrome miasténico congénito
Cl^-	*ABCC7*	Fibrosis quística

sido útil experimentalmente: la toxina marcada radiactivamente fue usada para cuantificar el receptor durante su purificación. ■

RESUMEN 11.3 Transporte de solutos a través de membranas

■ El movimiento de iones y de compuestos polares a través de las membranas biológicas requiere proteínas transportadoras. Algunos transportadores sólo facilitan la difusión pasiva a través de la membrana desde concentración mayor a una concentración menor. Otros transportan solutos en contra de un gradiente electroquímico; ello requiere una fuente de energía metabólica.

■ Los transportadores, al igual que los enzimas, presentan saturación y estereoespecificidad hacia sus sustratos. El transporte a través de estos sistemas puede ser pasivo o activo. El transporte activo primario está impulsado por ATP o por reacciones de transferencia electrónica; el transporte activo secundario, por el flujo acoplado de dos solutos, uno de los cuales (a menudo H^+ o Na^+) fluye a favor de su gradiente electroquímico al tiempo que el otro es impulsado en contra de su gradiente.

■ Los transportadores GLUT, tales como GLUT1 de los eritrocitos, transportan glucosa al interior de las células por transporte pasivo. Estos transportadores son transportadores sencillos o uniport y acarrean un solo sustrato. Los cotransportadores paralelos o simport, permiten el paso simultáneo de dos sustancias en la misma dirección; el transportador de lactosa de *E. coli* impulsado por la energía de un gradiente de protones (simport lactosa-H^+) y el transportador de glucosa de las células epiteliales del intestino, impulsado por un gradiente de Na^+ (simport glucosa-Na^+) son ejemplos de cotransportadores paralelos (simport). Los cotransportadores antiparalelos (antiport) facilitan el paso simultáneo de dos sustancias en direcciones opuestas; ejemplos de este tipo son el intercambiador de cloruro-bicarbonato de los eritrocitos y la Na^+K^+ ATPasa que es ubicua.

■ En las células animales, la Na^+ K^+ ATPasa mantiene las diferencias entre las concentraciones citosólica y extracelular de Na^+ y K^+. El gradiente de Na^+ resultante se usa como fuente de energía para diversos procesos de transporte activo secundario.

■ La Na^+ K^+ ATPasa de la membrana plasmática y los transportadores de Ca^{2+} de los retículos sarcoplasmático y endoplasmático (las bombas SERCA) son ejemplos de ATPasas tipo P; experimentan fosforilación reversible durante su ciclo catalítico. Las bombas de protones ATPasa de tipo F (ATP sintasas) son fundamentales para los mecanismos de conservación de energía en mitocondrias y cloroplastos. Las ATPasas de tipo V producen gradientes de protones a través de diversas membranas intracelulares, entre ellas las membranas de las vacuolas en las plantas.

■ Los transportadores ABC acarrean diversos sustratos (entre ellos muchos fármacos), fuera de las células, utilizando ATP como fuente de energía.

■ Los ionóforos son moléculas liposolubles que unen iones específicos y los transportan pasivamente a través de las membranas, disipando la energía de gradientes iónicos electroquímicos.

■ El agua se transporta a través de las membranas mediante acuaporinas. Algunas acuoporinas están reguladas; algunas también transportan glicerol o urea.

■ Los canales iónicos proporcionan poros hidrofílicos a través de los cuales pueden difundir iones seleccionados, a favor de sus gradientes eléctrico o de concentración química; Estos canales tienen como característica su insaturabilidad así como niveles de flujo muy elevados y son sumamente específicos para un ión. Muchos canales iónicos presentan un mecanismo de compuerta regulada por voltaje o por un ligando. El canal de Na^+ neuronal es de compuerta regulada por voltaje mientras que el canal iónico del receptor de acetilcolina está regulado por la acetilcolina que desencadena cambios de conformación que abren y cierran el paso transmembrana.

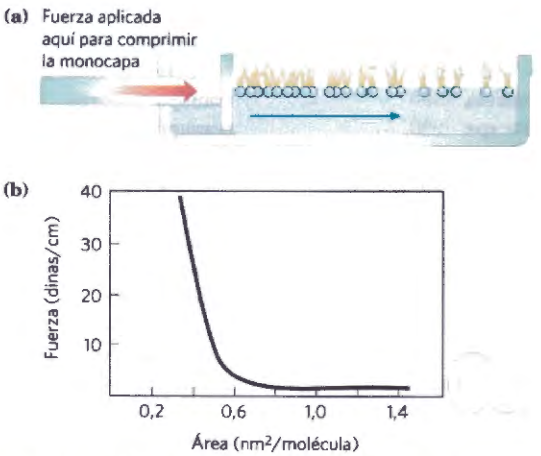
Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

modelo de mosaico fluido 389
micela 390
bicapa 390
vesícula 390
proteínas integrales 391
monotópicas 391
politópicas 391
proteínas periféricas 391
proteínas anfitrópicas 392
lípido anular 394
índice hidropático 394
barril β 395
porina 395
regla del interior positivo 395
proteína anclada GPI 397
estado líquido desordenado (I_d) 397
estado líquido ordenado (I_o) 397
flipasas 399
flopasas 399
escramblasas 399
FRAP 400
microdominios 401
balsas 401
caveolina 402
caveolas 402
dominio BAR 403
proteína de fusión 404
vSNARE 404
tSNARE 404
caderinas 405
selectinas 405
difusión simple 406
potencial de membrana (V_m) 406
gradiente electroquímico 406
potencial electroquímico 406
transportadores 406
transporte pasivo 406
transporte activo 406
canales iónicos 407
K_t ($K_{transporte}$) 408
electroneutro 412
cotransporte 412
cotransporte antiparalelo (antiport) 412
cotransporte paralelo (simport) 412
transporte simple (uniport) 412
electrogénico 413
ATPasas tipo P 414
bomba SERCA 415
Na^+K^+ ATPasa 415
ATPasas tipo V 416
ATPasas tipo F 416
ATP sintasa 416
Transportadores ABC 417
transportadores multifármacos ABC 418
transportador de lactosa 419
superfamilia facilitadora principal (MFS) 420
cotransportadores paralelos Na^+-glucosa 421
ionóforo 423
acuaporinas (AQP) 423
canal regulado por ligando 425
canal regulado por voltaje 425
patch-clamping 426
receptor nicotínico de acetilcolina 428

Problemas

1. Determinación del área de la sección transversal de una molécula de lípido Cuando los fosfolípidos se extienden cuidadosamente sobre la superficie del agua, se orientan en la interfase aire-agua con sus grupos de cabeza en el agua y sus colas hidrofóbicas en el aire. El aparato experimental (**a**) se ha diseñado de tal manera que reduce el área superficial disponible a una capa de lípidos. Midiendo la fuerza necesaria para apretar los lípidos, es posible determinar en qué momento las moléculas están empaquetadas compactamente en una monocapa continua; cuando se está próximo a esta área, la fuerza necesaria para reducir aun más el área superficial aumenta bruscamente (**b**). ¿Cómo utilizaría este aparato para determinar el área media ocupada por una sola molécula de lípido en la monocapa?



2. Pruebas sobre la bicapa lipídica En 1925, E. Gorter y F. Grendel utilizaron un aparato como el descrito en el Problema 1 para determinar el área superficial de una monocapa lipídica formada por lípidos extraídos de eritrocitos de diversas especies animales. Utilizaron un microscopio para medir las dimensiones de las células individuales a partir de las que calcularon el área superficial media de un eritrocito. Obtuvieron los datos que se muestran en la tabla. ¿Estaba justificado que estos investigadores concluyeran que los "cromocitos [eritrocitos] estaban cubiertos por una capa de sustancias grasas que tiene dos moléculas de espesor" (es decir, una bicapa lipídica)?

Animal	Volumen de las células empaquetadas (mL)	Número de células (por mm²)	Área superficial total de la monocapa lipídica de las células (m²)	Área superficial total de un eritrocito (μm^2)
Perro	40	8.000.000	62	98
Oveja	10	9.900.000	6,0	29,8
Hombre	1	4.740.000	0,92	99,4

3. Número de moléculas de detergente por micela Cuando se disuelve en agua una pequeña cantidad del detergente dodecil sulfato sódico (SDS; $Na^+CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-$), los iones del detergente entran en la solución en forma de especies monoméricas. A medida que se añade más detergente, se alcanza una concentración (concentración micelar crítica) a la que los monómeros se asocian para formar micelas. La concentración micelar crítica del SDS es 8,2 mM. Las micelas tienen una masa de partícula media (la suma de las masas moleculares de los monómeros constituyentes) de 18.000. Calcule el número de moléculas de detergente en una micela media.

4. Propiedades de los lípidos y de las bicapas lipídicas Las bicapas lipídicas formadas entre dos fases acuosas tienen esta importante propiedad: forman hojas bidimensionales, cuyos bordes se colocan muy cercanos uno del otro para poder autosellarse y formar una vesícula (liposoma).
¿Qué propiedades de los lípidos son responsables de esta propiedad de las bicapas? Explíquelo.
¿Qué consecuencias tiene esta propiedad en lo que se refiere a la estructura de las membranas biológicas?

5. Longitud de una molécula de ácido graso La longitud del enlace carbono-carbono para carbonos unidos por enlace sencillo tal como los que se dan en una cadena acilo graso saturada es de unos 1,5 Å. Calcule la longitud de una molécula individual de palmitato en su forma totalmente extendida. Si se dispusieran cola con cola dos moléculas de palmitato ¿cómo sería su longitud total en relación con el espesor de la bicapa lipídica de una membrana biológica?

6. Localización de una proteína de membrana Se han efectuado sobre una proteína de membrana desconocida, X, las siguientes observaciones. Puede ser extraída a partir de membranas de eritrocito rotas en una solución salina concentrada, y puede ser cortada en fragmentos por enzimas proteolíticos. El tratamiento de los eritrocitos con enzimas proteolíticos seguido de rotura y extracción de los componentes de la membrana rinde X intacta. Sin embargo, el tratamiento de los "fantasmas" (ghosts) de eritrocito (que consisten únicamente en membranas plasmáticas, producidas al romper las células y eliminar la hemoglobina) con enzimas proteolíticos seguido de la rotura y extracción da X extensamente fragmentada. ¿Qué indican estas observaciones sobre la localización de X en la membrana plasmática? ¿Las propiedades de X se parecen a las de una proteína de membrana integral o a las de una proteína periférica?

7. Predicción de la topología de una proteína de membrana a partir de la secuencia Ha clonado el gen de una proteína de eritrocito humano, de la que sospecha que es una proteína de membrana. A partir de la secuencia nucleotídica del gen, conoce la secuencia aminoácida. Partiendo de esta secuencia solamente, ¿cómo evaluaría la posibilidad de que la proteína fuera una proteína integral? Suponga que se demuestra que la proteína es una proteína integral con un segmento transmembrana. Sugiera experimentos bioquímicos o químicos que le permitan determinar si la proteína está orientada con el extremo amino en el exterior o en el interior de la célula.

8. Densidad superficial de una proteína de membrana Se puede inducir a *E. coli* para que sintetice cerca de 10.000 copias del transportador de lactosa (M_r 31.000) por célula. Suponga que *E. coli* es un cilindro de 1 μm de diámetro y 2 μm de longitud. ¿Qué fracción de la superficie de la membrana plasmática está ocupada por las moléculas de transportador de lactosa? Explique cómo ha llegado a esta conclusión.

9. Especies moleculares en la membrana de *E. coli* La membrana plasmática de *E. coli* está formada aproximadamente por 75% de proteína y 25% de fosfolípido en peso. ¿Cuántas moléculas de lípido de membrana están presentes por cada molécula de proteína de membrana? Suponga una M_r

promedio para la proteína de 50.000 y una M_r promedio de 750 para el fosfolípido. ¿Qué más necesitaría saber para calcular la fracción de la superficie de membrana cubierta por lípidos?

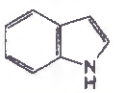
10. Dependencia de la difusión lateral respecto a la temperatura El experimento descrito en la Fig. 11-16 se realizó a 37 °C. Si el experimento se hubiese llevado a cabo a 10 °C ¿qué efecto esperaría sobre la velocidad de difusión? ¿Por qué?

11. Autosellado de la membrana Las membranas celulares son autosellantes (si son agujereadas o rotas mecánicamente, se vuelven a sellar automática y rápidamente). ¿Qué propiedades de las membranas son las responsables de esta importante característica?

12. Temperaturas de fusión de lípidos Los lípidos de membrana en muestras de tejidos obtenidos de diferentes partes de la pata de un reno tienen diferente composición de ácidos grasos. Los lípidos de membrana del tejido cercano a la pezuña contienen una proporción mayor de ácidos grasos insaturados que los de tejidos de la parte superior de la pata. ¿Cuál es el significado de esta observación?

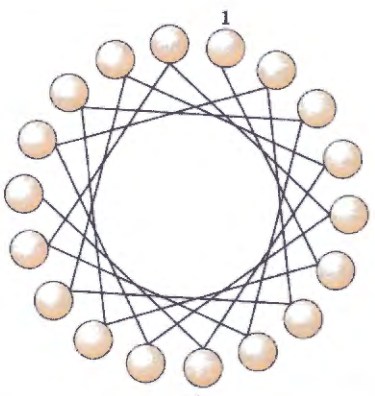
13. Difusión flip-flop La cara interna (monocapa) de la membrana de un eritrocito humano está constituida predominantemente por fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. La cara externa está formada predominantemente por fosfatidilcolina y esfingomielina. Aunque los componentes fosfolipídicos de la membrana pueden difundir en la bicapa fluida, esta diferencia entre una cara y otra se mantiene siempre. ¿Cómo?

14. Permeabilidad de la membrana A pH 7, el triptófano cruza una bicapa lipídica unas 1.000 veces más lentamente de cómo lo hace el indol, una sustancia estrechamente relacionada:



Sugiera una explicación para esta observación.

15. Utilización del diagrama de la rueda helicoidal Una rueda helicoidal es una representación bidimensional de una hélice vista a lo largo del eje central (véase la Fig. 11-29b; véase también la Fig. 4-4d). Utilice el diagrama de la rueda helicoidal aquí mostrada para determinar la distribución de residuos aminoácidos en un segmento helicoidal con la secuencia –Val-Asp-Arg-Val-Phe-Ser-Asn-Val-Cys-Thr-His-Leu-Lys-Thr-Leu-Gln-Asp-Lys-



¿Qué puede decir acerca de las propiedades superficiales de esta hélice? ¿Cómo cree que estaría orientada la hélice en la estructura terciaria de una proteína integral de membrana?

16. Síntesis del jugo gástrico: Energética El jugo gástrico (pH 1,5) se produce por bombeo de HCl del plasma sanguíneo (pH 7,4) al estómago. Calcule la cantidad de energía libre necesaria para concentrar el H^+ en 1 L de jugo gástrico a 37 °C. En las condiciones celulares, ¿cuántos moles de ATP deben hidrolizarse para proporcionar esta cantidad de energía libre? La variación de energía libre para la hidrólisis del ATP en condiciones celulares es aproximadamente de -58 kJ/mol (tal como explicaremos en el Capítulo 13). Ignore los efectos del potencial eléctrico transmembrana.

17. Energética de la Na^+K^+ATPasa Para una célula típica de vertebrado con un potencial de membrana de –0,070 V (interior negativo) ¿cuál es la variación de energía libre para transportar 1 mol de Na^+ desde la célula hacia la sangre a 37 °C? Considere que la concentración de Na^+ en el interior de la célula es 12 mM y la del plasma sanguíneo es 145 mM.

18. Acción de la ouabaína en tejido renal La ouabaína inhibe específicamente la actividad de la Na^+K^+ ATPasa de tejidos animales pero no se sabe que inhiba ningún otro enzima. Cuando se añade ouabaína a láminas delgadas de tejido renal vivo, inhibe el consumo de oxígeno en un 66%. ¿Por qué? ¿Qué nos dice esta observación sobre la utilización de la energía respiratoria por el tejido renal?

19. Energética del cotransporte paralelo Suponga que determina experimentalmente que un sistema de transporte de glucosa celular, impulsado por un cotransportador paralelo de Na^+, puede acumular glucosa hasta concentraciones 25 veces superiores a la del medio externo, mientras que la $[Na^+]$ externa era sólo diez veces mayor que la $[Na^+]$ intracelular. ¿Violaría esto las leyes de la termodinámica? En caso negativo, ¿cómo podría explicar esta observación?

20. Marcado del transportador de lactosa El transportador de lactosa de una bacteria, que es altamente específico para la lactosa, contiene un residuo de Cys que es esencial para su actividad de transporte. La reacción covalente de la *N*-etilmaleimida (NEM) con este residuo de Cys inactiva irreversiblemente al transportador. Una elevada concentración de lactosa en el medio impide la inactivación por NEM, probablemente al proteger estéricamente el residuo de Cys, que está en el sitio de unión a lactosa o cerca de él. No conoce nada más de la proteína transportadora. Sugiera un experimento que le permita determinar la M_r del polipéptido transportador que contiene Cys.

21. Captación intestinal de leucina Está estudiando la captación de L-leucina por células epiteliales de intestino de ratón. Mediciones de la velocidad de captación de L-leucina y de varios de sus análogos, con y sin Na^+ en el tampón de ensayo, dan los resultados que se muestran en la tabla. ¿Qué puede concluir sobre las propiedades y el mecanismo del transportador de leucina? ¿Esperaría que la captación de L-leucina fuera inhibida por ouabaína?

	Captación en presencia de Na^+		Captación en ausencia de Na^+	
Sustrato	V_{max}	K_t (mM)	V_{max}	K_t (mM)
L-Leucina	420	0,24	23	0,2
D-Leucina	310	4,7	5	4,7
L-Valina	225	0,31	19	0,31

22. Efecto de un ionóforo sobre el transporte activo Considere el transportador de leucina descrito en el Pro-

blema 19. ¿Cambiarían V_{max} y/o K_t si añadiese un ionóforo de Na^+ a la solución de ensayo que ya contiene Na^+? Explíquelo

23. Flujo de agua a través de una acuaporina Cada eritrocito humano tiene unos 2×10^8 monómeros de AQP1. Si las moléculas de agua fluyen a través de la membrana plasmática a una velocidad de 5×10^8 moléculas de H_2O por tetrámero de AQP1 por segundo, y el volumen de un eritrocito es de 5×10^{-11} mL, ¿cuánto tardaría un eritrocito en reducir a la mitad su volumen cuando encuentra la alta osmolaridad (1 M) del fluido intersticial de la médula renal? Suponga que el eritrocito está formado únicamente por agua.

Bioquímica en Internet

24. Predicción de la topología de una proteína de membrana I Las herramientas bioinformáticas online hacen que el análisis de hidropatía sea fácil si conoce las secuencia de aminoácidos de una proteína. En el Protein Data Bank (www.pdb.org), el Protein Feature View muestra información adicional sobre una proteína recogida a partir de otras bases de datos, tales como UniProt y SCOP2. Una visión gráfica sencilla de una gráfica de hidropatía utilizando una ventana de 15 residuos muestra regiones hidrofóbicas en rojo y regiones hidrofílicas en azul.

(a) Con solo mirar las gráficas de hidropatía mostradas en el Protein Feature View ¿qué predicciones podría hacer sobre la topología de membrana de estas proteínas: glucoforina A (PDB ID 1AFO) y acuaporina (PDB ID 2B6O)?

(b) A Continuación, refine su información utilizando las herramientas ProtScale en el portal de recursos bioinformáticos ExPASy. Cada una de las Protein Feature Views del PDB se creó con un UniProt Knowledgebase ID. En el caso de la glucoforina, el UniProtKB ID es P02724; para la mioglobina, P02185 y para la acuporoina, Q6J8I9. Vaya al portal ExPASy (http://web.expasy.org/protscale) y seleccione la opción de análisis hidropático Kyte & Doolittle, con una ventana de 7 aminoácidos. Entre el UniProtKB ID de la acuoporina Q6J8I9, que también puede obtener de la página Protein Feature View del PDB, seleccione a continuación la opción para analizar la cadena completa (residuos 1 a 263). Utilice los valores por defecto para las otras opciones y haga click sobre Submit para obtener una gráfica de hidropatía. Guarde una imagen GIF de esta gráfica. Repita ahora el análisis utilizando una ventana de 15 aminoácidos. Compare los resultados entre los análisis con las ventanas de 7 y de 15 residuos. ¿Cuál de las dos le da una razón señal-ruido mejor?

(c) ¿En qué circunstancias sería importante utilizar una ventana más estrecha?

25. Topología de proteínas de membrana II El receptor de la hormona adrenalina en células animales es una proteína integral de membrana (M_r 64.000) que se cree que tiene siete regiones que abarcan la membrana.

(a) Demuestre que una proteína de este tamaño es capaz de cruzar la membrana siete veces.

(b) Dada la secuencia de aminoácidos de esta proteína, ¿cómo predeciría qué regiones de la proteína forman las hélices que cruzan la membrana?

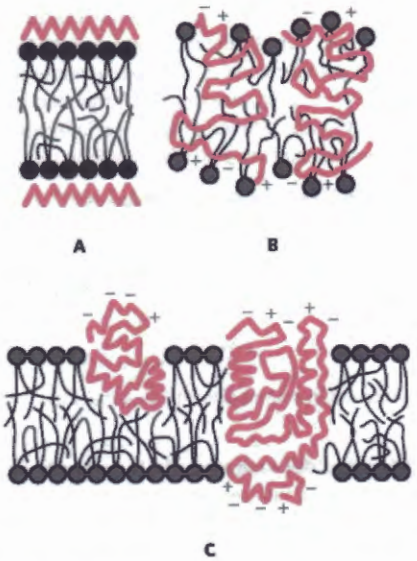
(c) Vaya a la página web del Protein Data Bank (www.pdb.org). Use el identificador PDB 1DEP para obtener la página de datos de una porción del receptor β-adrenérgico (un tipo de receptor de adrenalina) de pavo. Usando JSmol para explorar la estructura, prediga si esta porción del receptor está localizada dentro de la membrana o en la superficie de la membrana. Explique su respuesta. Ahora utilice la Protein Feature View para ver el análisis hidropátiucoi de la secuencia. ¿Está de acuerdo con su respuesta?

(d) Recupere los datos para una porción de otro receptor, el receptor de acetilcolina de neuronas y miocitos, usando el identificador PDB 1A11. Al igual que en (c), prediga dónde se encuentra esta porción del receptor y explique su respuesta.

Si no ha usado el PDB, vea el Recuadro 4-4 para más información.

Problema basado en el análisis de datos

26. El modelo de mosaico fluido de la estructura de las membranas biológicas La Figura 11-3 muestra el modelo de mosaico fluido de la estructura de las membranas biológicas tal como se acepta actualmente. Este modelo se presentó en detalle en un artículo de revisión de S.J. Singer en 1971. En este artículo, Singer presentó los tres modelos de estructura de la membrana que se habían propuesto por aquel entonces:



A. Modelo de Davson-Danielli-Robertson. Este era el modelo que contaba con mayor aceptación en 1971 cuando se publicó la revisión de Singer. En este modelo, los fosfolípidos se distribuyen en una bicapa. Las proteínas se encuentran en ambas superficies de la bicapa, unidas a ella mediante interacciones iónicas entre los grupos de cabeza cargados de los fosfolípidos y grupos cargados de las proteínas. Muy importante, no se encuentran proteínas en el interior de la bicapa.

B. Modelo de la subunidad de lipoproteína de Benson. Aquí, las proteínas son globulares y la membrana es una mezcla lípido-proteína. Las colas hidrofóbicas de los lípidos están incrustadas en las partes hidrofóbicas de las proteínas. Los grupos de cabeza de los lípidos están expuestos al disolvente. No existe una bicapa lipídica.

C. Modelo del mosaico lípido-proteína globular. Este modelo se muestra en la Figura 11-3. Los lípidos forman una bicapa y las proteínas están incrustadas en ella. Algunas proteínas se extienden a través de la bicapa mientras que otras no. Las proteínas están ancladas en la bicapa mediante interacciones hidrofóbicas entre las colas hidrofóbicas de los lípidos y las porciones hidrofóbicas de la proteína

Para los datos que se dan a continuación, considere de qué modo cada fragmento de información se alinea con cada uno de los tres modelos de estructura de la membrana. ¿Qué modelo(s) está sostenido, cual no lo está y qué reservas tiene acerca de los datos o su interpretación? Explique su razonamiento.

(a) Cuando se fijaron las células, se tiñeron con tetróxido de osmio y se examinaron al microscopio electrónico, las membranas mostraron una apariencia de "vía de tren", con dos líneas oscuras separadas por un espacio claro.

(b) Se encontró que el grosor de las membranas en células fijadas y teñidas de la misma manera era de 5 a 9 nm. El grosor de una bicapa de fosfolípido "desnuda", sin proteínas, fue de 4 a 4,5 nm. El grosor de una monocapa sencilla de proteínas es de alrededor de 1 nm.

(c) En este artículo Singer escribió: "La composición de aminoácidos promedio de las proteínas de membrana no se puede distinguir de la de las proteínas solubles. En particular, una fracción sustancial de los residuos son hidrofóbicos".

(d) Tal como se describió en los Problemas 1 y 2 de este capítulo, los investigadores han extraído membranas de las células, extraído los lípidos y comparado el área de la monocapa lipídica con el área de la membrana celular original. La interpretación de los resultados se complicó a causa de la cuestión ilustrada en el Problema 1: el área de la monocapa dependía de lo fuerte que se la empujaba. Con presiones muy suaves, la razón entre el área de la monocapa y el área de la membrana era de aproximadamente 2,0. A presiones más elevadas (que se cree se parecen más a las que se encuentran en las células) la razón fue sustancialmente menor.

(e) La espectroscopia de dicroísmo circular utiliza cambios en la polarización de la luz UV para obtener datos acerca de la estructura secundaria de las proteínas (véase la Fig. 4-10). En promedio, esta técnica mostró que las proteínas de membrana tienen una gran cantidad de hélice α y poco o nada de hoja β. Este hallazgo estaba de acuerdo con que la mayor parte de las proteínas de membrana tenían una estructura globular.

(f) La fosfolipasa C es un enzima que elimina los grupos de cabeza polares (incluido el fosfato) de los fosfolípidos. En varios estudios, el tratamiento de membranas intactas con fosfolipasa C eliminó alrededor del 70% de los grupos de cabeza sin destruir la estructura en forma de "vía de tren" de las membranas.

(g) Singer describió en su artículo un estudio en el que "una glucoproteína de masa molecular aproximada de 31.000 en las membranas celulares de los glóbulos rojos humanos se cortaba mediante tratamiento tríptico de las membranas dando glucopéptidos solubles de unos 10.000 de masa molecular, mientras que las porciones restantes eran muy "hidrofóbicas". El tratamiento con tripsina no produjo grandes cambios en las membranas las cuales permanecieron intactas.

La revisión de Singer también incluía otros muchos estudios en esta área. Al final, sin embargo, los datos disponibles en 1971 no probaron de forma conclusiva que el modelo C era correcto. A medida que se han acumulado más datos, este modelo de estructura de la membrana ha sido aceptado por la comunidad científica.

Referencia

Singer, S.J (1971) The molecular organization of biological membranes. En *Structure and Function of Biological Membranes* (Rothfield, L.I., ed.), pp. 145–222, Academic Press, Inc., New York.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 12

Bioseñalización

Las herramientas de auto-estudio que sirven para practicar lo aprendido y reforzar los conceptos presentados en este capítulo se encuentran disponibles en la red. Visite www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

12.1 Características generales de la transducción de señales 437

12.2 Receptores acoplados a proteínas G y segundos mensajeros 440

12.3 GPCR en la visión, el olfato y el gusto 456

12.4 Receptores tirosina quinasa 460

12.5 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G 465

12.6 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana 467

12.7 Canales iónicos de compuerta regulada 470

12.8 Regulación de la transcripción por receptores nucleares de hormonas 473

12.9 Señalización en microorganismos y plantas 474

12.10 Regulación del ciclo celular por proteína quinasa 475

12.11 Oncogenes, genes supresores de tumores y muerte celular programada 480

La capacidad de las células para recibir y actuar en respuesta a señales que provienen de más allá de la membrana plasmática es fundamental para la vida. Las células bacterianas reciben información constante de proteínas de la membrana que actúan como receptores de información y analizan del medio que les rodea el pH, la fuerza osmótica, la disponibilidad de alimento, oxígeno y luz, y la presencia de sustancias nocivas, depredadores o competidores para el alimento. Estas señales provocan respuestas apropiadas, tales como el movimiento hacia el alimento o el alejamiento de sustancias toxicas o la formación de esporas latentes en un medio carente de nutrientes. En organismos pluricelulares, células con diferentes funciones intercambian una amplia variedad de señales. Las células vegetales responden a hormonas de crecimiento y a variaciones de la luz solar. Las células animales intercambian información sobre las concentraciones de iones y glucosa en los fluidos extracelulares, y las actividades metabólicas interdependientes que tienen lugar en diferentes tejidos y, en un embrión, la localización correcta de las células durante su desarrollo. En todos estos casos, la señal representa *información* que es detectada por receptores específicos y se convierte en una respuesta celular en la que siempre interviene un proceso *químico*. Esta conversión de información en cambio químico, **transducción de señal**, es una propiedad universal de las células vivas.

12.1 Características generales de la transducción de señales

Las transducciones de señal son extraordinariamente específicas y refinadamente sensibles. La **especificidad** se consigue por complementariedad molecular precisa entre las moléculas señal y receptor **(Fig. 12-1a)**, en la que intervienen el mismo tipo de fuerzas débiles (no covalentes) que tienen lugar en las interacciones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo. Los organismos multicelulares tienen un nivel de especificidad adicional ya que los receptores para una señal determinada, o las dianas intracelulares de una determinada vía de señalización, sólo están presentes en ciertos tipos de células. La hormona liberadora de tirotropina, por ejemplo, desencadena respuestas en las células de la hipófisis anterior pero no en hepatocitos, que carecen de receptores para esta hormona. La adrenalina altera el metabolismo del glucógeno en los hepatocitos pero no en los adipocitos; en este caso ambos tipos celulares tienen receptores para esta hormona, pero mientas que los hepatocitos poseen glucógeno y el enzima metabolizador de glucógeno que se estimula por adrenalina, los adipocitos no contienen ni el uno ni el otro. Los adipocitos responden a la adrenalina metabolizando triacilgliceroles para liberar ácidos grasos que son posteriormente transportados a otros tejidos.

Tres factores explican la extraordinaria sensibilidad de la transducción de señales: la elevada afinidad de los receptores para las moléculas señal, la cooperatividad (a menudo pero no siempre) en la interacción entre el ligando y el receptor y la amplificación de la señal por

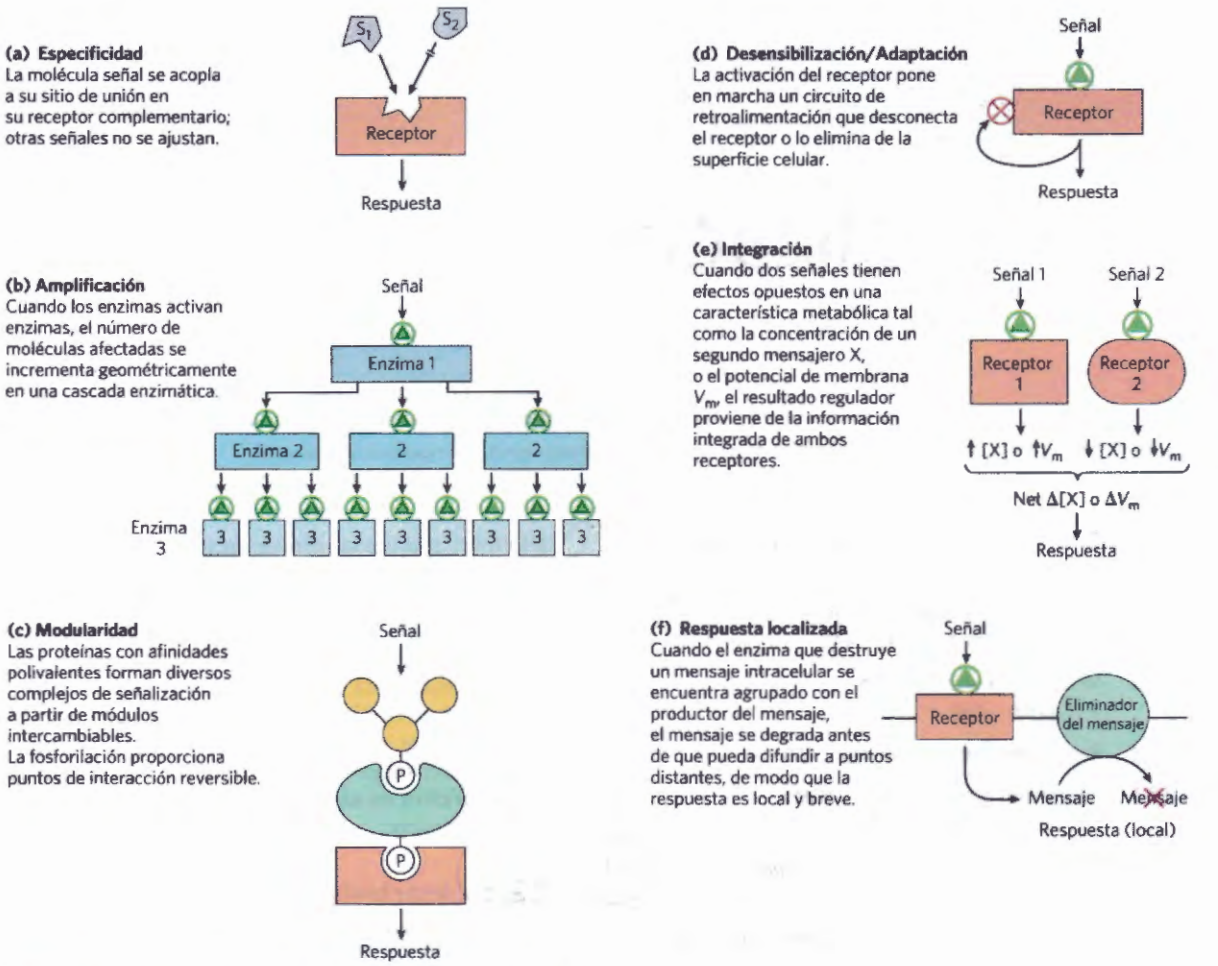


FIGURA 12-1 Seis características de los sistemas de transducción de señal.

cascadas enzimáticas. La **afinidad** entre la señal (ligando) y el receptor puede expresarse como la constante de disociación K_d, a menudo 10^{-7} M o menos, lo que quiere decir que el receptor puede detectar concentraciones picomolares de una molécula señal.

La **cooperatividad** en las interacciones entre el ligando y el receptor acarrea grandes cambios en la activación del receptor con pequeños cambios en la concentración de ligando (recuerde el efecto de cooperatividad en la unión de oxígeno a la hemoglobina; véase la Fig. 5-12). La **amplificación** tiene lugar cuando un enzima asociado con un receptor de señal se activa y, a su vez, cataliza la activación de muchas moléculas de un segundo enzima, cada una de las cuales activa muchas moléculas de un tercer enzima, y así sucesivamente en lo que se denomina **cascada enzimática** (Fig. 12-1b). Estas cascadas dan lugar a amplificaciones de varios órdenes de magnitud en milisegundos. La respuesta a una señal también debe terminarse de modo que los efectos a lo largo de la ruta sean proporcionales a la fuerza del estímulo original.

Las proteínas señalizadoras interactuantes son **modulares**. Muchas proteínas señalizadoras tienen múltiples dominios que reconocen rasgos específicos en otras proteínas, o en el citoesqueleto o en la membrana plasmática. Esta modularidad permite que la célula mezcle y ponga en contacto un conjunto de moléculas señalizadoras para crear una amplia variedad de complejos multienzimáticos con funciones o localizaciones celulares diferentes. Un tema común en estas interacciones es la unión de una proteína señalizadora con capacidad de modulación a residuos fosforilados en otra; la interacción resultante puede ser regulada por fosforilación o desfosforilación de la proteína complementaria (Fig. 12-1c). **Proteínas de armazón** no enzimáticas con afinidad hacia diversos enzimas que interaccionan en cascadas ponen en contacto dichas proteínas asegurando su interacción en localizaciones celulares específicas en momentos específicos. Muchos de los dominios involucrados en interacciones proteína-proteína son intrínsecamente desordenados (véase la Fig. 4-22), capaces de plegarse de manera diferente según cual sea la proteína con la que interaccionan. En consecuencia, una única proteína puede desempeñar múltiples funciones en las rutas de señalización.

La sensibilidad de los sistemas receptores está sujeta a modificación. Cuando una señal está presente continuamente, el sistema receptor se **desensibiliza** (Fig. 12-1d); de manera que ya no responde a la señal. Cuando el estímulo disminuye por debajo de un determinado umbral, el sistema a vuelve a ser sensible. Piense en lo que sucede a su sistema de transducción visual cuando pasa desde un sitio iluminado con luz del sol brillante a una habitación oscura o desde la oscuridad a la luz.

La **integración** de señales (Fig. 12-1e) es la capacidad del sistema para recibir múltiples señales y generar una respuesta unificada y adecuada a las necesidades combinadas de la célula o el organismo. Diferentes rutas de señalización interaccionan entre ellas a diversos niveles, generando una compleja comunicación de señales que mantiene la homeostasis en la célula y el organismo.

Una última característica notable de los sistemas de transducción de señal es la **localización de la respuesta** dentro de la célula (Fig. 12-1f). Cuando los componentes de un sistema de señalización se hallan confinados en un estructura subcelular específica (una balsa en la membrana plasmática, por ejemplo), la célula puede regular un proceso localmente, sin afectar a regiones más distantes.

Una de las revelaciones de la investigación sobre la señalización es la notable conservación de los mecanismos de señalización durante la evolución. A pesar de que el número de señales biológicas es probablemente de varios miles (la Tabla 12-1 lista algunos tipos importantes), y que la variedad de respuestas a dichas señales es comparablemente numerosa, la maquinaria para transducir todas estas señales se construye a partir de 10 tipos básicos de proteínas.

En este capítulo examinamos algunos ejemplos de las principales clases de mecanismos de señalización, y veremos cómo son integrados en funciones biológicas específicas tales como la respuesta a hormonas y factores de crecimiento, los sentidos de la vista, olfato, y gusto, la transmisión de señales nerviosas y el control del ciclo celular. A menudo, el resultado final de una vía de señalización es la fosforilación de unas pocas proteínas diana específicas, lo que modifica sus actividades alterando así las actividades de la célula. A lo largo de nuestra exposición pondremos énfasis en la conservación de mecanismos fundamentales para la transducción de señales biológicas y la adaptación de estos mecanismos básicos a una gran variedad de vías de señalización.

Consideraremos aquí los detalles moleculares de diversos sistemas de transducción de señal representativos, clasificados según el tipo de receptor. El desencadenante para cada sistema es diferente pero las características generales de la transducción de señal son comunes para todos: una señal interacciona con un receptor; el receptor activado interacciona con la maquinaria celular produciendo una segunda señal o un cambio en la actividad de una proteína celular; la actividad metabólica de la célula diana experimenta un cambio; y finalmente, el fenómeno de transducción se acaba. Para ilustrar estas características generales de los sistemas de señalización, aportamos ejemplos de cada uno de los seis mecanismos básicos de señalización **(Fig. 12-2)**.

1. *Receptores acoplados a proteína G* que activan *indirectamente* (a través de proteínas que unen GTP, o proteínas G) enzimas que producen segundos mensajeros intracelulares. Este tipo de receptor se ilustra con el sistema receptor β-adrenérgico que detecta adrenalina (epinefrina) (Sección 12.2). La visión, el olfato y el gusto son sistemas sensores que también operan a través de receptores acoplados a proteínas G (Sección 12.3).
2. *Enzimas receptores* de la membrana plasmática que poseen actividad enzimática en el lado citoplasmático y son activados por la unión de ligando en el lado extracelular. Por ejemplo , los receptores con actividad tirosina quinasa catalizan la fosforilación de residuos de Tyr en proteínas diana intracelulares específicas. Un ejemplo lo constituye el receptor de insulina (Sección 12.4); el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es otro ejemplo. También pertenecen a esta clase general los receptores guanilil ciclasas (Sección 12.5).
3. *Los canales iónicos de compuerta* de la membrana plasmática que se abren y se cierran (de ahí el término "gate(d)" "compuerta") en respuesta a la unión de ligandos químicos o cambios en el potencial transmembrana. Éstos son los transductores de señal más sencillos.
4. *Receptores nucleares* que se unen a su ligando específico (tal como la hormona estrógeno) y alteran la velocidad a la que genes específicos son transcritos y traducidos en proteínas celulares. Debido a que las hormonas esteroides funcionan a través de mecanismos íntimamente relacionados con la regulación de la expresión génica, los consideramos aquí sólo brevemente (Sección 12.8) y aplazamos una discusión detallada de su acción hasta el Capítulo 28.

Al empezar esta discusión de la señalización biológica, no están de más unas palabras sobre la nomenclatura de las proteínas de señalización. Estas proteínas se descubren normalmente dentro de un contexto y se nombran de acuerdo con el mismo; después se comprueba que intervienen en una gama más amplia de funciones biológicas para las que el nombre original no es de gran ayuda. Por ejemplo, la proteína del retinoblastoma, pRb, se identificó inicialmente como el sitio de una mutación que contribuye al cáncer de retina (retinoblastoma), pero se sabe ahora que funciona en muchas vías esenciales para la división celular en todas las células, no sólo en las de la retina. Algunos genes y proteínas reciben nombres neutros: la proteína supresora de tumores p53, por ejemplo, es una proteína de *53* kDa, pero su nombre no da ninguna pista sobre su gran importancia en la regulación de la división celular y en el desarrollo del cáncer. En este capítulo definimos generalmente estos nombres de proteínas a medida que los encontramos, introduciendo los nombre usados nor-

TABLA 12-1 Algunas señales a las que responden las células

Antígenos	Luz
Glucoproteínas de la superficie celular/ oligosacáridos	Contacto mecánico
Señales del desarrollo	Patógenos bacterianos y de insectos
Componentes de la matriz extracelular	Neurotransmisores
Factores de crecimiento	Nutrientes
Hormonas	Sustancias olorosas
Hipoxia	Feromonas
	Saborizantes

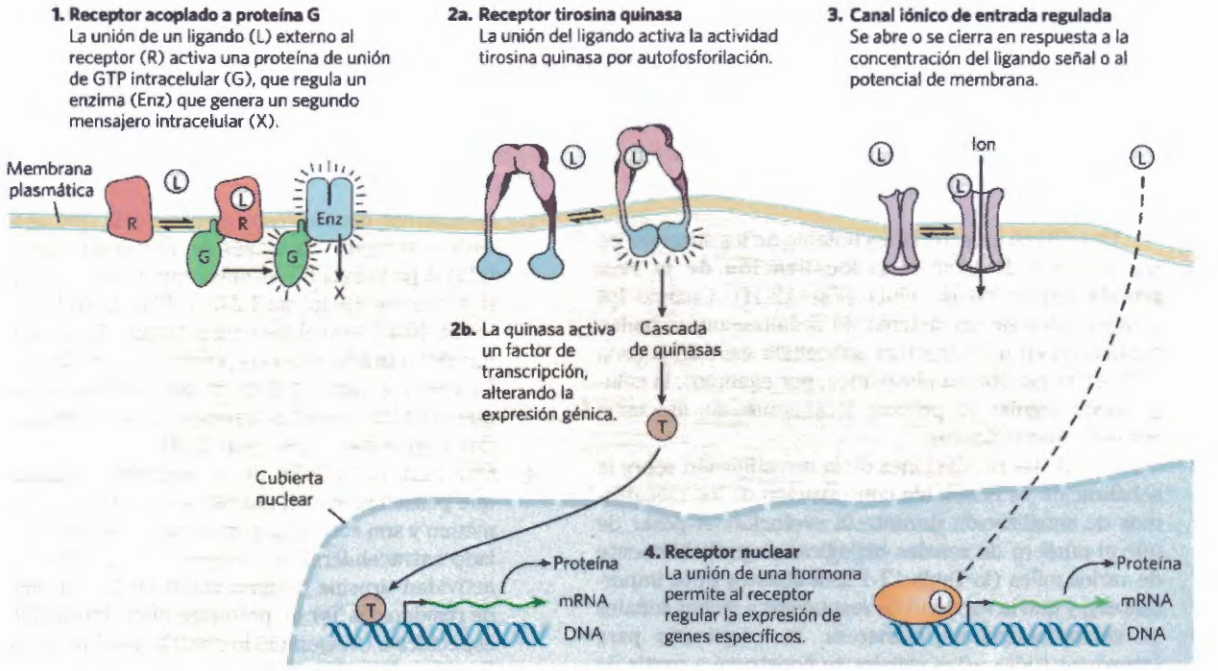


FIGURA 12-2 Cuatro tipos generales de transductores de señal.

malmente por los investigadores en cada campo. ¡No se desanime si no puede asimilarlos todos de golpe la primera vez que los encuentre!

RESUMEN 12.1 Características generales de la transducción de señal

- Todas las células tienen mecanismos de transducción de señales altamente sensibles y específicos, que se han conservado durante la evolución.
- Una amplia variedad de estímulos, actúan a través de proteínas receptoras específicas en la membrana plasmática.
- Los receptores unen la molécula señal e inician un proceso que amplifica la señal, la integra con la señal de entrada de otros receptores, y transmite la información por toda la célula o en algunos casos a una región concreta de la célula. Si la señal persiste, la desensibilización del receptor reduce o termina la respuesta.
- Los organismos multicelulares tienen cuatro tipos generales de mecanismos de señalización: proteínas de la membrana plasmática que actúan a través de proteínas G, receptores con actividad enzimática (como por ejemplo tirosina quinasas), canales iónicos de compuerta y receptores nucleares que unen esteroides y alteran la expresión génica.

12.2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros

Tal como su nombre implica, **los receptores acoplados a proteína G (GPCR)** sin receptores que actúan a través de un miembro de la familia de **proteínas de unión a nucleótido de guanosina** o **proteínas G**. La transducción de señal a través de GPCR está definida por tres componentes esenciales: un receptor de membrana plasmática con siete segmentos helicoidales transmembrana, una proteína G que alterna entre forma activa (GTP unido) e inactiva (GDP unido) y un enzima efector (o canal iónico) en la membrana plasmática que es regulado por la proteína G activada. Una señal extracelular, como una hormona, un factor de crecimiento o un neurotransmisor es el "primer mensajero" que activa un receptor desde fuera de la célula. Cuando el receptor se activa, su proteína G asociada intercambia su GDP unido por un GTP del citosol. A continuación, la proteína G se disocia del receptor activado y se une a un enzima efector próximo, alterando su actividad. El enzima efector produce un cambio en la concentración citosólica de un metabolito de bajo peso molecular o de un ion inorgánico, que actúa como un **segundo mensajero** activando o inhibiendo una o más dianas posteriores en la ruta, generalmente proteína quinasas.

El genoma humano codifica más de 800 GPCR, aproximadamente 350 de los cuales actúan en la detección de hormonas, factores de crecimiento y otros ligandos endógenos, y aproximadamente 500 que sirven como receptores olorosos y gustativos. Se ha implicado a los GPCR en muchas enfermedades humanas comunes, entre ellas alergias, depresión, ceguera, diabetes y diversos defectos cardiovasculares con serias consecuencias para la salud. También se han encontrado mutaciones en GPCR en un 20% de los cánceres. Más de un tercio de *todos* los medicamentos del mercado tienen como objetivo un GPCR u otro. Por ejemplo, el receptor β-adrenérgico, que interviene en los efectos de la adrenalina, es la diana de los "bloqueadores beta" prescritos para enfermedades tan diversas como la hipertensión, la arritmia cardiaca, el glaucoma, la ansiedad y la migraña. Más de 100 de los GPCR que se encuentran en el genoma humano son aún "receptores

huérfanos": no se han identificado todavía sus ligandos naturales por lo que no sabemos nada acerca de su biología. El receptor β-adrenérgico, con su biología y farmacología bien conocidas es el prototipo de todos los GPCR por lo que nuestro análisis de los sistemas de transducción de señal empieza aquí. ■

El sistema receptor β-adrenérgico actúa a través del segundo mensajero cAMP

La adrenalina hace sonar la alarma cuando alguna amenaza requiere que el organismo movilice su maquinaria de producción de energía; señala la necesidad de luchar o huir. La acción de la adrenalina empieza cuando la hormona se une a un receptor proteico en la membrana plasmática de una célula sensible a la hormona. Los **receptores adrenérgicos** son de cuatro tipos generales, α_1, α_2, β_1 y β_2, definidos por diferencias en sus afinidades y respuestas a un grupo de agonistas y antagonistas. Los **agonistas** son análogos estructurales que se unen a un receptor y reproducen los efectos de su ligando natural; los **antagonistas** son análogos que se unen al receptor sin provocar el efecto normal y bloquean así los efectos de los agonistas, ligando biológico incluido. En algunos casos, la afinidad de un agonista o antagonista sintético hacia el receptor es mayor que la del agonista natural **(Fig. 12-3)**. Los cuatro tipos de receptores adrenérgicos se encuentran en diferentes tejidos diana y dan lugar a respuestas diferentes frente a la adrenalina. Aquí nos centramos en los **receptores β-adrenérgicos** de músculo, hígado y tejido adiposo. Estos receptores provocan cambios en el metabolismo energético, tal como se describe en el Capítulo 23, incluidos el incremento en la degradación del glucógeno y de las grasas. Los receptores adrenérgicos de los subtipos β_1 y β_2 actúan a través del mismo mecanismo, por lo que en nuestra discusión, "β-adrenérgico" hace referencia a los dos tipos.

Al igual que todos los GPCR, el receptor β-adrenérgico es una proteína integral con siete regiones hidrofóbicas de 20 a 28 residuos aminoácidos que abarcan la membrana plasmática siete veces (de ahí el nombre alternativo para los GPCR: **receptores heptahelicoidales**). La unión de adrenalina a un sitio del receptor en la profundidad de la membrana plasmática **(Fig. 12-4a**, paso ❶) promueve un cambio de conformación en el dominio intracelular del receptor que afecta su interacción con una proteína G asociada que promueve la disociación de GDP y la unión de GTP del citosol (paso ❷. Para todos lo GPCR, la proteína G es heterotrimérica, con tres subunidades diferentes α, β y γ. Por este motivo tales proteínas G se conocen como **proteínas G triméricas**. En este caso es la subunidad α la que une GDP o GTP y transmite la señal desde el receptor activado a la proteína efectora. Debido a que esta proteína G activa su efector, es conocida como **proteína G estimuladora**, o $\mathbf{G_s}$. Al igual que otras proteínas G (véase Recuadro 12-1), G_s funciona como un "interruptor" biológico. Cuando el sitio de unión a nucleótido de G_s (en la subunidad α) está ocupado por GTP, G_s es activa y puede activar su proteína efectora (en este caso la adenilil ciclasa); con GDP unido al sitio, G_s es inactiva. En la forma activa, las subunidades β y γ de G_s se disocian de la subunidad α, en forma de dímero $b\gamma$ y $G_{s\alpha}$, con

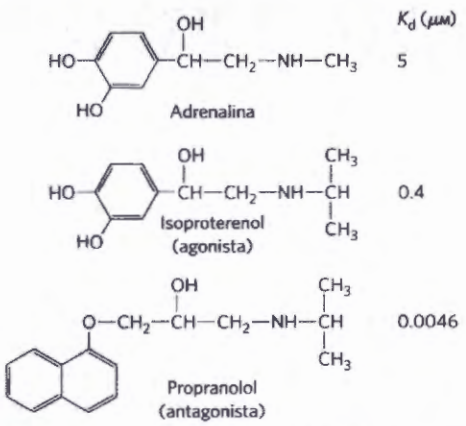


FIGURA 12-3 Adrenalina y sus análogos sintéticos. La adrenalina, (epinefrina en USA) se libera desde las glándulas suprarrenales o glándula adrenal y regula el metabolismo generador de energía en músculo, hígado y tejido adiposo. Sirve también como neurotransmisor en neuronas adrenérgicas. La afinidad por su receptor se expresa en forma de una constante de disociación del complejo receptor-ligando. El isoproterenol y el propranolol son análogos sintéticos, uno de ellos agonista con una afinidad por el receptor superior a la de la adrenalina y el otro un antagonista con una afinidad extremadamente elevada.

su GTP unido, se desplaza en el plano de la membrana desde el receptor a una molécula cercana de adenilil ciclasa (paso ❸). $G_{s\alpha}$ se mantiene unida a la membrana por un grupo palmitilo unido covalentemente (véase la Fig. 11-13).

La **adenilil ciclasa** es una proteína integral de la membrana plasmática con su sitio activo en la cara citosólica. La asociación de $G_{s\alpha}$ activa con la adenilil ciclasa estimula la ciclasa para catalizar la síntesis de cAMP a partir de ATP (Fig. 12-4a, paso ❹; y Fig. 12-4b), elevando la [cAMP] citosólica. La interacción entre $G_{s\alpha}$ y la adenilil ciclasa sólo es posible cuando la $G_{s\alpha}$ está unida a GTP. El genoma de mamíferos codifica nueve isoenzimas de adenilil ciclasa localizados en la membrana, todos ellos con secuencias muy conservadas aunque, presumiblemente, con funciones distintas.

La estimulación por $G_{s\alpha}$ es autolimitante; $G_{s\alpha}$ *tiene una actividad GTPasa intrínseca que inactiva* $G_{s\alpha}$ al convertir su GTP unido en GDP **(Fig. 12-5)**. La $G_{s\alpha}$ ahora inactiva se disocia de la adenilil ciclasa, con lo que se inactiva la ciclasa. $G_{s\alpha}$ se reasocia con el dímero $\beta\gamma$ ($G_{s(\beta\gamma)}$), y el G_s inactivo está de nuevo disponible para interaccionar con un receptor unido a hormona.

El papel de $G_{s\alpha}$ como interruptor o conmutador biológico no es único. Diversas proteínas G actúan como conmutadores binarios en sistemas de señalización con GPCR y en muchos procesos en los que interviene la fusión o fisión de membranas (Recuadro 12-1).

La adrenalina ejerce sus efectos posteriores a través del aumento de la [cAMP] resultante de la activación de la adenilil ciclasa. A su vez el AMP cíclico activa alostéricamente la **proteína quinasa dependiente de cAMP**, también llamada **proteína quinasa A** o **PKA**, (Fig. 12-4a, paso ❺), que cataliza la fosforilación específica de residuos Ser o Thr de proteínas diana, incluida la glucógeno fosforilasa *b* quinasa. Este último enzima es activo cuando está fosforilado y así puede iniciar el proceso de movilización del glucógeno a partir de las reservas en el músculo y en el hígado en antici-

RECUADRO 12-1 Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad (*continua*)

Alfred G. Gilman y Martin Rodbell descubrieron los papeles cruciales de las proteínas de unión de nucleótidos de guanosina (proteínas G) en un gran número de procesos celulares, entre los que se cuentan la percepción sensorial, la señalización para la división celular, crecimiento y diferenciación, los movimientos intracelulares de proteínas y vesículas membranosas y la síntesis de proteínas. El genoma humano codifica casi 200 de estas proteínas, las cuales difieren en tamaño y estructura de subunidades, localización intracelular y función. No obstante, todas las proteínas G comparten una característica común: pueden ser activadas y, a continuación, después de un breve período, se autoinactivan, sirviendo, de este modo, como interruptores binarios con temporizadores incorporados. Esta superfamilia de proteínas incluye las proteínas G triméricas que intervienen en la señalización adrenérgica (G_s y G_i) y en la visión (transducina); pequeñas proteínas G tales como las que intervienen en la señalización de la insulina (Ras) y otras que funcionan en el tránsito de vesículas (ARF y Rab), transporte al interior del núcleo y salida del mismo (Ran; véase la Fig. 27-44) y coordinación del ciclo celular (Rho) además de diversas proteínas que intervienen en la síntesis de proteínas (factor de inicio IF2 y factores de elongación EF-Tu y EF-G; véase el Capítulo 27). Muchas proteínas G tienen lípidos unidos covalentemente lo que les confiere afinidad por las membranas y dictan su localización en la célula.

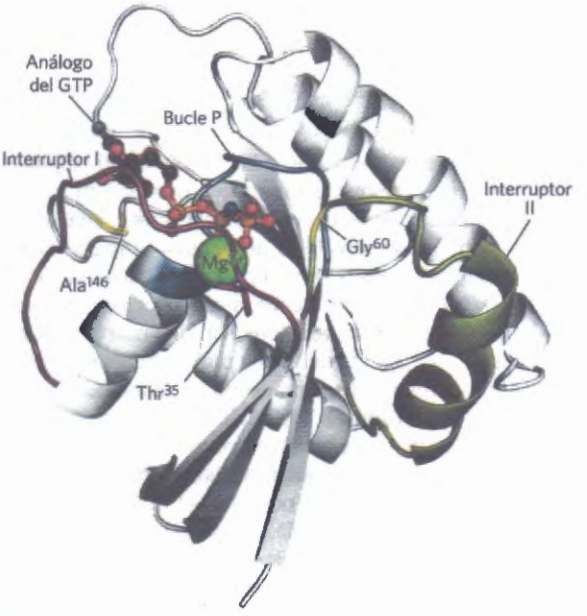


FIGURA 1 Proteína Ras, prototipo de todas las proteínas G. El Mg^{2+}-GTP se mantiene mediante residuos críticos del bucle P de unión de fosfato (azul) y por la Thr^{35} en la región del interruptor I (rojo)y la Gly^{60} en el interruptor II (verde). La Ala^{146} proporciona especificidad favorable al GTP respecto al ATP. En esta estructura se encuentra el análogo no hidrolizable del GTP, Gpp(NH)p, en el sitio de unión de GTP. [Fuente: PDB ID 5P21, E.F. Pai et al, *EMBO J.* 9:2351, 1990.]



Alfred G. Gilman, 1941-2015 [Fuente: Shelly Katz/Liasion Agency/Getty Images.]



Martin Rodbell, 1925-1998 [Fuente: Cortesía de Andrew M. Rodbell.]

Todas las proteínas G tienen la misma estructura núcleo y utilizan el mismo mecanismo para pasar de una conformación inactiva, favorecida cuando está unido GDP, y una conformación activa, favorecida por la unión de GTP. Podemos utilizar la proteína Ras (~20 kDa), unidad mínima de señalización, como prototipo de todos los miembros de esta superfamilia (Fig. 1).

En la conformación con GTP unido, la proteína G expone regiones previamente sepultadas (denomina-

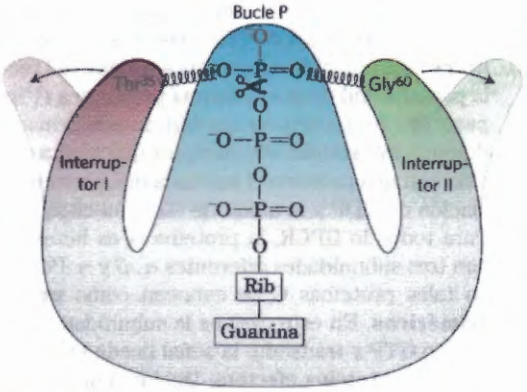


FIGURA 2 Cuando se hidroliza el GTP unido, por las actividades GTPasa de Ras y sus GAP, la pérdida de los enlaces de hidrógeno con Thr^{35} y Gly^{60} permite que las regiones de los interruptores I y II se relajen adoptando una conformación en la que ya no están disponibles para interaccionar con dianas posteriores tales como Raf.

das **interruptor I** e **interruptor II**) que interaccionan con proteínas que intervienen posteriormente en la ruta de señalización, hasta que la proteína G se autoinactiva al hidrolizar su GTP unido a GDP. El determinante clave de la conformación de la proteína G es el fosfato γ del GTP, que interacciona con una región denominada **bucle P** (de unión de fosfato; Fig. 2). En Ras el γ fosfato del GTP se une a un residuo Lys del bucle P y a dos residuos clave, Thr^{35} en el interruptor I y a Gly^{60} en el interruptor II, que se unen por enlace de hidrógeno a los oxígenos del fosfato γ del GTP. Estos enlaces de hidrógeno actúan como un par de muelles que mantienen la proteína en su conformación activa. Cuando se corta el GTP a GDP y se libera P_i, se pierden estos puentes de hidrógeno; la proteína se relaja a su conformación inactiva, sepultando los sitios que interaccionan con otras moléculas asociadas en su estado activo. Ala^{146} se une por enlace de hidrógeno con el oxígeno de la guanina permitiendo que se una el GTP pero no ATP.

La actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G se incrementa hasta 10^5 veces por **proteínas activadoras de la GTPasa (GAP)**, también llamadas, en el caso de las proteínas G heterotriméricas, **reguladores de la señalización por proteína G (RGS**; Fig. 3). Las GAP (y los RGS) determinan así cuanto tiempo permanece abierto el interruptor. Estas moléculas aportan un residuo Arg clave que alcanza el sitio activo de la GTPasa presente en la proteína G donde contribuye a la catálisis. El proceso intrínsecamente lento de reemplazar el GDP unido por GTP, que activa la proteína está catalizado por **factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF)** asociados con la proteína G (Fig. 3). El receptor β-adrenérgico unido a ligando es uno de los muchos GEF, y una amplia gama de proteínas actúan como GAP. Su efecto combinado marca el nivel de proteínas G unidas a GTP y, por tanto, la intensidad de la respuesta a las señales que llegan a los receptores.

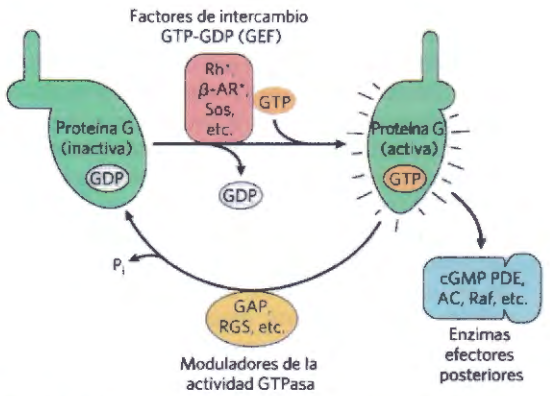


FIGURA 3 Muchos factores regulan la actividad de las proteínas G (verde). Las proteínas G inactivas, tanto las proteínas G pequeñas tales como Ras como las proteínas G heterotriméricas tales como G_s interaccionan con factores de intercambio GTP-GDP anteriores en la vía, GEF (rojo). Estos factores de intercambio suelen ser receptores activados (*) tales como la rodopsina (Rh) y receptores β-adrenérgicos (AR). Las proteínas G se activan por unión a GTP y en su forma unida a GTP activan enzimas efectores posteriores en la vía (azul), tales como cGMP fosfodiesterasa (PDE), adenilil ciclasa (AC) y Raf. Las proteínas activadoras de la GTPasa (GAP en el caso de proteínas G pequeñas) y los reguladores de la señalización por proteína G (RGS) (amarillo), al modular la actividad GTPasa de las proteínas G, determinan el tiempo durante el que la proteína G permanecerá activa.

Debido a que las proteínas G tienen papeles cruciales en tantos procesos de señalización, no es sorprendente que las proteínas G defectuosas produzcan diversas enfermedades. Alrededor del 25% de todos los cánceres humanos (y en una proporción mucho mayor en ciertos tipos de cáncer) presentan una mutación en una proteína Ras (de manera típica en uno de los residuos clave alrededor del sitio de unión de GTP en el bucle P) que prácticamente elimina su actividad GTPasa. Una vez activada por la unión de GTP, esta proteína Ras permanece constitutivamente activa promoviendo la división celular en células que no deberían dividirse. El gen supresor tumoral *NF1* codifica una GAP que incrementa la actividad GTPasa de la Ras normal. Las mutaciones en *NF1* que dan lugar a una GAP no funcional dejan Ras con solo su actividad GTPasa intrínseca, que es muy débil (tiene un número de recambio muy bajo); una vez activada por la unión de GTP, Ras permanece activa durante un largo período de tiempo y continúa enviando la señal: dividirse.

Las proteínas G heterotriméricas defectuosas también pueden ser causa de enfermedad. Las mutaciones en el gen que codifica la subunidad α de G_s (que interviene en los cambios de [cAMP] en respuesta a estímulos hormonales) pueden dar lugar a una G_α que es activa, o inactiva, de manera permanente. Las mutaciones "activadoras" tienen lugar generalmente en residuos clave para la actividad GTPasa; llevan a una [cAMP] elevada de forma continuada, con importantes consecuencias en el resto de la vía entre las que se cuentan una proliferación celular indeseable. Tales mutaciones se encuentran, por ejemplo, en cerca del 40% de tumores de la hipófisis (adenomas). Los individuos con mutaciones "inactivadoras" en G_α no responden a las hormonas (tales como la hormona tiroidea) que actúan a través de cAMP. La mutación en el gen de la subunidad α de la transducina (T_α), implicada en la señalización visual, conduce a un tipo de ceguera nocturna, debida aparentemente a una interacción defectuosa entre la subunidad T_α activada y la fosfodiesterasa del segmento exterior del bastón

(Continua en la página siguiente)

RECUADRO 12-1 Proteínas G: interruptores binarios en salud y enfermedad

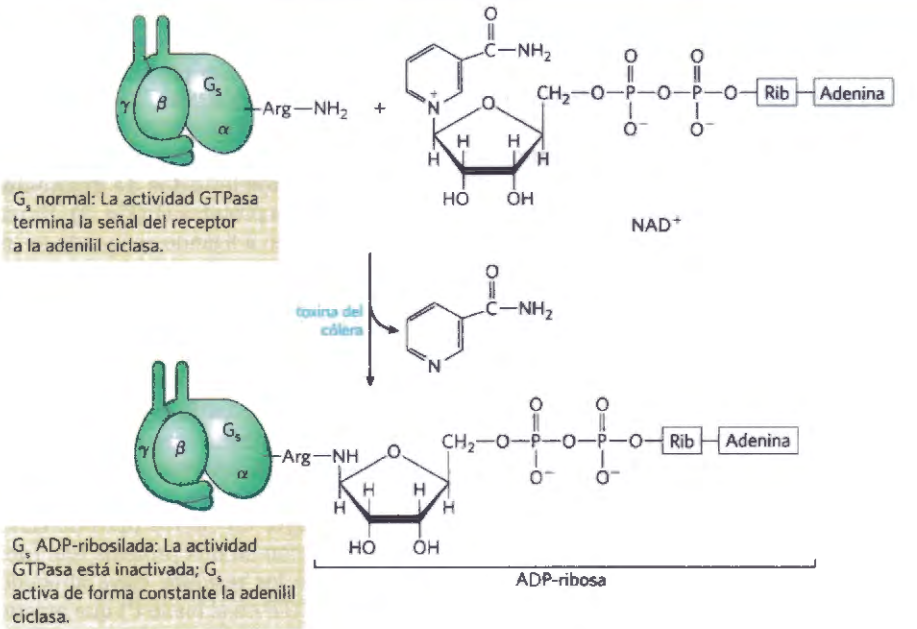


FIGURA 4 La toxina bacteriana responsable del cólera es un enzima que cataliza la transferencia de la porción ADP-ribosa del NAD^+ a un residuo Arg de G_s. Las proteínas G así modificadas no responden a los estímulos hormonales normales. La patología del cólera es el resultado de una regulación defectuosa de la adenilil ciclasa con sobreproducción de cAMP.

(véase la Fig. 12-14). Una variación en la secuencia del gen que codifica la subunidad β de una proteína G heterotrimérica se encuentra frecuentemente en individuos con hipertensión (presión sanguínea elevada) y se sospecha que la variante de este gen está involucrada en la obesidad y en la aterosclerosis.

La bacteria patógena causante del cólera y la tos ferina produce una toxina cuya diana es una proteína G, interfiriendo en la señalización normal de las células huésped. La **toxina del cólera**, secretada por *Vibrio cholerae* en el intestino de una persona infectada, es una proteína heterodimérica. La subunidad B reconoce gangliósidos específicos de la superficie de las células epiteliales intestinales a los que se une proporcionando una ruta para que la subunidad A entre en estas células. Una vez en el interior la subunidad A se rompe en dos fragmentos, A1 y A2. Seguidamente A1 se asocia con el factor de ADP-ribosilación ARF6, una proteína G pequeña, a través de residuos de sus regiones interruptoras I y II, que sólo son accesibles cuando ARF6 está en su forma activa (GTP unido). Esta asociación con ARF6 activa A1, que cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD^+ hasta el residuo Arg crítico del bucle P de la subunidad α de G_s (Fig. 4). La ADP-ribosilación bloquea la actividad GTPasa de G_s por lo que G_s es activa de modo permanente. Esto produce la activación continua de la adenilil ciclasa de las células epiteliales del intestino, es decir [cAMP] crónicamente elevada y una PKA crónicamente activa. La PKA fosforila el canal de Cl^- CFTR (véase el Recuadro 11-2) y un intercambiador de Na^+–H^+ en las células epiteliales del intestino. La salida de NaCl resultante provoca una salida masiva de agua a través del intestino al responder las células al consiguiente desequilibrio osmótico. Los principales rasgos patológicos del cólera son la deshidratación severa y la pérdida de electrolitos, que en ausencia de una terapia de rehidratación urgente pueden resultar mortales.

pación a las necesidades energéticas señaladas por la adrenalina.

La forma inactiva de la PKA contiene dos subunidades catalíticas idénticas (C) y dos subunidades reguladoras idénticas (R) **(Fig. 12-6a)**. El complejo tetramérico R_2C_2 es catalíticamente inactivo, debido a que un dominio autoinhibidor de cada subunidad R ocupa el sitio de unión a sustrato de cada subunidad C. El AMP cíclico es un activador alostérico de la PKA. Cuando se une cAMP a las subunidades R, éstas experimentan un cambio de conformación que mueve el dominio autoinhibidor de R fuera del dominio catalítico de C con lo que se disocia el complejo R_2C_2 dando dos subunidades C catalíticamente activas libres. Este mismo mecanismo básico, desplazamiento de un dominio autoinhibidor, interviene en la activación alostérica de muchos tipos de proteína quinasas por sus segundos mensajeros (como en las Figs. 12-18 y 12-25, por ejemplo). La estructura de la hendidura de unión del sustrato de PKA es el prototipo de todas las proteína quinasas conocidas (Fig. 12-6b); ciertos residuos de esta hendidura tienen equivalentes idénticos en la totalidad de las 544 proteína quinasas codificadas

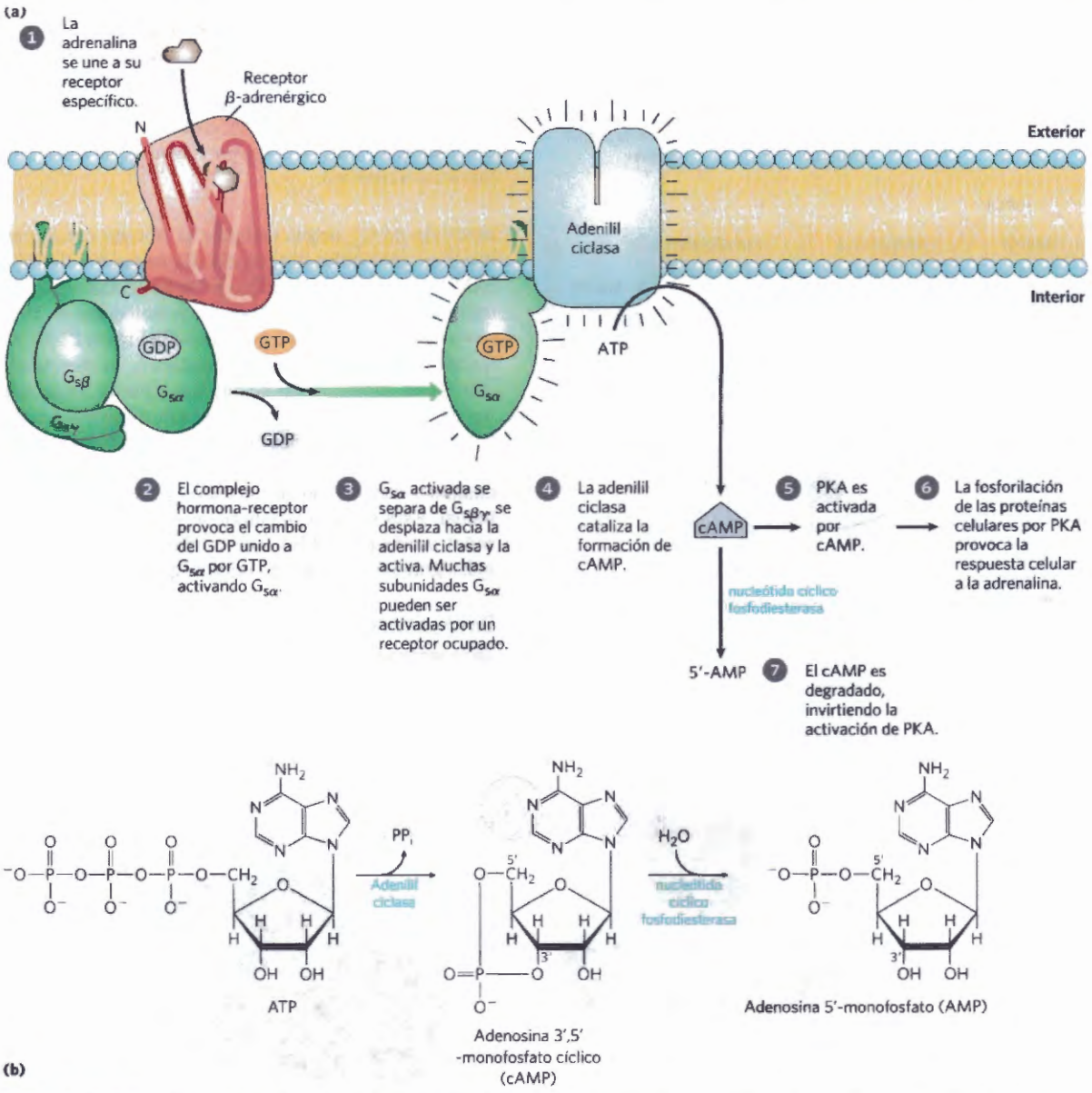


FIGURA 12-4 Transducción de la señal de la adrenalina: la vía β-adrenérgica. (a) El mecanismo que acopla la unión de la adrenalina a su receptor con activación de la adenilil ciclasa; las siete etapas se discuten más ampliamente en el texto. La misma molécula de adenilil ciclasa en la membrana plasmática puede ser regulada por una proteína G estimuladora (G_s), tal como se muestra, o por una proteína G inhibidora (G_i, no mostrada). G_s y G_i están bajo la influencia de diferentes hormonas. Las hormonas que inducen la unión de GTP a G_i provocan la *inhibición* de la adenilil ciclasa, dando como resultado una [cAMP] celular menor. **(b)** Acción combinada de los enzimas que catalizan los pasos ❶ y ❷, síntesis e hidrólisis de cAMP por la adenilil ciclasa y la cAMP fosfodiesterasa, respectivamente.

en el genoma humano. El sitio de unión de ATP de cada subunidad catalítica posiciona perfectamente el ATP para la transferencia de su grupo fosforilo terminal (γ) al –OH de la cadena lateral de un residuo Ser o Thr.

Tal como se indica en la Figura 12-4a (paso ❻), la PKA regula diversos enzimas posteriores en la ruta de señalización. Aunque estas dianas posteriores tienen funciones diversas, comparten una región con similitud de secuencia alrededor del residuo Ser o Thr que experimenta fosforilación, secuencia que los marca para la regulación por la PKA (Tabla 12-2). El sitio de unión de sustrato en la hendidura de la PKA reconoce estas secuencias y fosforila sus residuos Thr o Ser. La comparación de las secuencias de diversas proteínas sustrato de la PKA ha permitido establecer la **secuencia consenso**, es decir, los residuos vecinos específicos necesarios para marcar un residuo Ser o Thr para su fosforilación.

Al igual que en múltiples rutas de señalización, la transducción de señal por la adenilil ciclasa impone varias etapas que *amplifican* la señal hormonal original **(Fig. 12-7)**. Primero, la unión de una molécula de hormona a un molécula de receptor activa catalíticamente varias moléculas de G_s que se asocian con el receptor activado, una después de otra. A continuación, mediante la activación de una molécula de adenilil ciclasa, cada

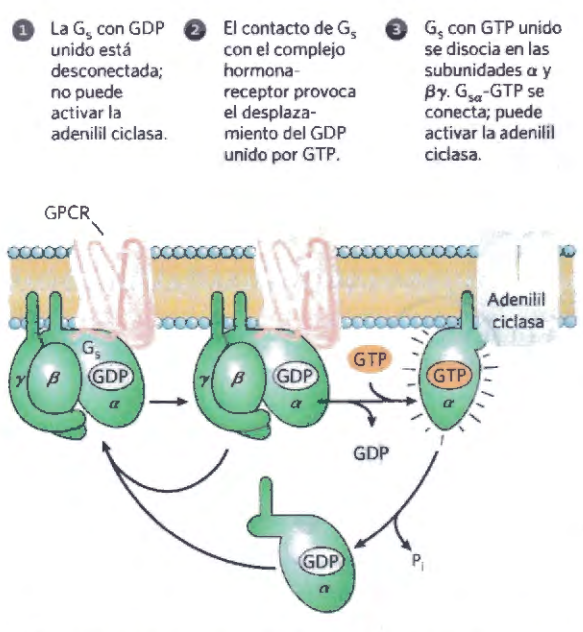


FIGURA 12-5 El interruptor de la GTPasa. Las proteínas G alternan entre GDP-unido (inactivas) y GTP-unido (activas). La actividad GTPasa intrínseca de la proteína, en muchos casos estimulada por proteínas RGS (regulators of G protein signaling: reguladores de la señalización por la proteína G; véase el Recuadro 12-2), determina la rapidez con que el GTP unido es hidrolizado a GDP, y por lo tanto cuánto tiempo permanece activa la proteína G.

molécula de $G_{s\alpha}$ activa estimula la síntesis catalítica de *muchas* moléculas de cAMP. El segundo mensajero cAMP activa ahora la PKA, cada molécula de la cual cataliza la fosforilación de *muchas* moléculas de la proteína diana (fosforilasa *b* quinasa en la Figura 12-7). Esta quinasa activa la glucógeno fosforilasa *b*, lo que conduce a la rápida movilización de glucosa a partir del glucógeno. El efecto neto de la cascada es la amplificación de la señal hormonal en varios órdenes de magnitud, lo que da cuenta de la muy baja concentración de adrenalina (o de cualquier otra hormona) necesaria para la actividad hormonal. Esta ruta de señalización es, además, rápida: la señal produce cambios intracelulares en el espacio de milisegundos o incluso de microsegundos.

Diversos mecanismos inducen la terminación de la respuesta del receptor β adrenérgico

Para que un sistema de transducción de señal sea útil se ha de *desconectar* cuando ha finalizado el estímulo ya sea hormonal o de otro tipo, por lo que los mecanismos

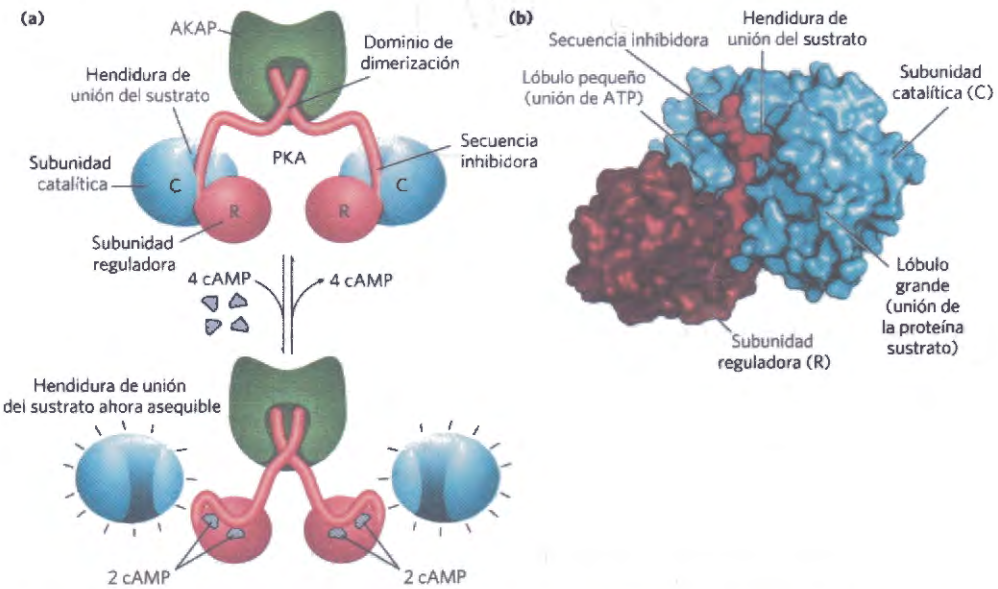


FIGURA 12-6 Activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). (a) Cuando [cAMP] es baja, las dos subunidades reguladoras idénticas (R; rojo) se asocian con las dos subunidades catalíticas idénticas (C). En este complejo R_2C_2, las secuencias inhibidoras de las subunidades R se encuentran en la hendidura de unión del sustrato de las subunidades C impidiendo la unión de sustratos proteicos; el complejo es, por tanto, catalíticamente inactivo. Las secuencias amino-terminales de las subunidades R interaccionan formando un dímero R_2, sitio de unión a una proteína de anclaje a una quinasa A (AKAP), descrita más adelante en el texto. Cuando la [cAMP] aumenta en respuesta a una señal hormonal, cada subunidad R une dos moléculas de cAMP experimentando una importante reorganización que tira de su secuencia inhibidora alejándola de la subunidad C al tiempo que abre la hendidura de unión del sustrato y libera cada subunidad C en su forma catalíticamente activa. **(b)** Estructura cristalina que muestra parte del complejo R_2C_2 (PDB ID 1U7E): una subunidad C y parte de una subunidad R. Se omite por motivos de claridad la región de dimerización amino-terminal de la subunidad R. El lóbulo pequeño de C contiene el sitio de unión de ATP y el lóbulo grande rodea y define la hendidura en donde se une la proteína sustrato que experimenta fosforilación en un residuo Ser o Thr con el grupo fosforilo transferido desde el ATP. En esta forma inactiva, la secuencia inhibidora de R bloquea la hendidura de unión del sustrato en C, inactivándola. [Fuente: PDB ID 3FHI, C. Kim et al., *Science* 307:690, 2005.]

TABLA 12-2 Algunos enzimas y otras proteínas regulados por fosforilación dependiente de cAMP (por PKA)

Enzima/proteína	Secuencia fosforilada[a]	Vía/proceso regulado
Glucógeno sintasa	RASCTSSS	Síntesis de glucógeno
Fosforilasa *b* quinasa		Degradación de glucógeno
Subunidad α	VEFRRLSI	
Subunidad β	RTKRSGSV	
Piruvato quinasa (hígado de rata)	GVLRRASVAZL	Glucólisis
Complejo de la piruvato deshidrogenasa (tipo L)	GYLRRASV	Piruvato a acetil-CoA
Lipasa sensible a hormona	PMRRSV	Movilización de triacilglicerol y oxidación de ácidos grasos
Fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa	LQRRRGSSIPQ	Glucólisis/gluconeogénesis
Tirosina hidroxilasa	FIGRRQSL	Síntesis de L-dopa, dopamina, noradrenalina y adrenalina
Histona H1	AKRKASGPPVS	Condensación de DNA
Histona H2B	KKAKASRKESYSVYVYK	Condensación de DNA
Fosfolambano cardíaco (un regulador del bombeo cardíaco)	AIRRAST	$[Ca^{2+}]$intracelular
Inhibidor-1 de proteína fosfatasa-1	IRRRRPTP	Desfosforilación proteica
Secuencia consenso PKA[b]	xR[RK]x[ST]B	Muchas

[a]El residuo S o T fosforilado se muestra en rojo. Todos los residuos están dados en sus símbolos de una letra (véase la Tabla 3-1).

[b]x es un aminoácido cualquiera; B es un aminoácido hidrofóbico cualquiera. Véase el Recuadro 3-2 para las convenciones utilizadas en la representación de las secuencias consenso.

de desconexión de la señal son intrínsecos a todos los sistemas de señalización. La mayoría de sistemas también se adaptan a la presencia continuada de la señal haciéndose menos sensibles a la misma, *desensibilizándose*. El sistema β-adrenérgico ilustra ambos mecanismos. Aquí nos centraremos en la terminación.

La respuesta a la estimulación β-adrenérgica terminará cuando la concentración de adrenalina en sangre descienda por debajo de su K_d con su receptor. Entonces, la hormona se disociará del receptor y éste volverá a adoptar su conformación inactiva en la que ya no puede activar G_s.

Una segunda manera de acabar la respuesta es la hidrólisis del GTP unido a la subunidad G_α, catalizada por la actividad GTPasa intrínseca de la proteína G. La conversión del GTP unido en GDP favorece el retorno de G_α a la conformación en la que une las subunidades $G_{\beta\gamma}$, conformación en la que la proteína G no puede interaccionar con la adenilil ciclasa o estimularla. Esto fina-

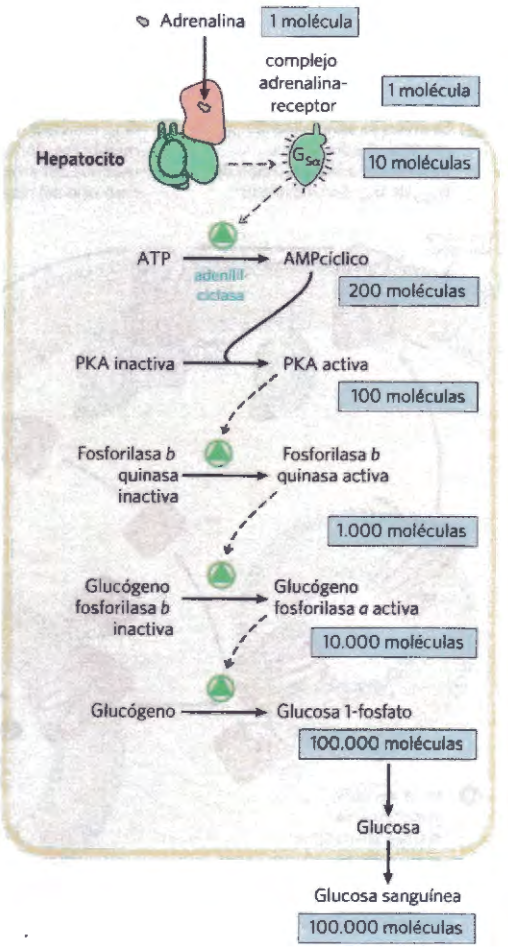


FIGURA 12-7 Cascada de la adrenalina. La adrenalina desencadena una serie de reacciones en hepatocitos en las que catalizadores activan catalizadores, dando como resultado una gran amplificación de la señal hormonal original. El número de moléculas mostradas sólo es para ilustrar la amplificación y son, con toda seguridad, una subestimación importante. La unión de una molécula de adrenalina a un receptor β-adrenérgico en la superficie celular activa un número (posiblemente centenares) de proteínas G, una después de otra, cada una de las cuales activa una molécula del enzima adenilil ciclasa. La adenilil ciclasa actúa catalíticamente, produciendo muchas moléculas de cAMP por cada adenilil ciclasa activada. (Dado que se requieren dos moléculas de cAMP para activar una subunidad catalítica de la PKA, este paso no amplifica la señal).

liza la producción de cAMP. La velocidad de inactivación de G_s depende de la actividad GTPasa que en el caso de G_α sola es muy débil. No obstante, las proteínas activadoras de la GTPasa (GAP) estimulan fuertemente esta actividad GTPasa provocando una más rápida inactivación de la proteína G (véase el Recuadro 12-1). Las GAP pueden ser reguladas por otros factores provocando una fina adaptación de la respuesta a la estimulación β-adrenérgica. Un tercer mecanismo para terminar la respuesta es eliminar el segundo mensajero: hidrólisis del cAMP a 5'-AMP (que no es activo como segundo mensajero) por la **nucleótido cíclico fosfodiesterasa** (Fig. 12-4a, paso ❼; 12-4b).

Finalmente, al acabar la ruta de señalización, los efectos metabólicos resultantes de la fosforilación enzimática son invertidos por la acción de las fosfoproteína fosfatasas, que hidrolizan los residuos de Ser, Thr o Tyr fosforilados con liberación de fosfato inorgánico (P_i). Unos 150 genes del genoma humano codifican fosfoproteína fosfatasas, menos que los que codifican proteína quinasas (544), lo que refleja la relativa promiscuidad de las fosfoproteína fosfatasas. Una sola fosfoproteína fosfatasa (PP1) desfosforila unas 200 dianas diferentes de fosfoproteína. Se sabe que algunas de estas fosfatasas están reguladas; otras pueden actuar de forma constitutiva. Cuando la [cAMP] disminuye y la PKA vuelve a su forma inactiva (paso ❼ en la Fig. 12-4a), el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación se inclina hacia la desfosforilación por estas fosfatasas.

El receptor β-adrenérgico se desensibiliza mediante fosforilación y por asociación con arrestina

Los mecanismos para la terminación de la señal descritos antes tienen lugar cuando desaparece el estímulo. Un mecanismo diferente, la desensibilización, apaga la respuesta *incluso mientras persiste la señal*. En la desensibilización del receptor β-adrenérgico interviene una proteína quinasa que fosforila el receptor en el dominio intracelular que normalmente interacciona con G_s **(Fig. 12-8)**. Cuando el receptor permanece ocupado por la adrenalina, la **receptor β-adrenérgico quinasa (βARK)** (también llamada a menudo **GRK2**; véase más adelante) fosforila varios residuos Ser cerca del extremo carboxilo-terminal del receptor, que se encuentra en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. La PKA, activada a causa del aumento en la [cAMP], se fosforila, y por lo tanto activa βARK. A continuación βARK es traslocada a la membrana plasmática gracias a su asociación con las subunidades $G_{s\beta\gamma}$, posicionándose para fosforilar al receptor. La fosforilación del receptor crea un sitio de unión para la proteína ***β*-arrestina**, o ***β*arr** (también denominada arrestina 2), y la unión de la β-arrestina bloquea lo sitios de unión del receptor con la proteína G **(Fig. 12-9)**. La unión de la β-arrestina también facilita el secuestro de las moléculas del receptor, es decir, su eliminación de la membrana plasmática por endocitosis en pequeñas vesículas intracelulares (endosomas). El complejo arrestina-receptor atrae clatrina y otras proteínas que intervienen en la formación de vesículas (véase la Fig. 27-27), las cuales inician la invaginación de la membrana que conduce a la formación de los endosomas que contienen el receptor adrenérgico. En

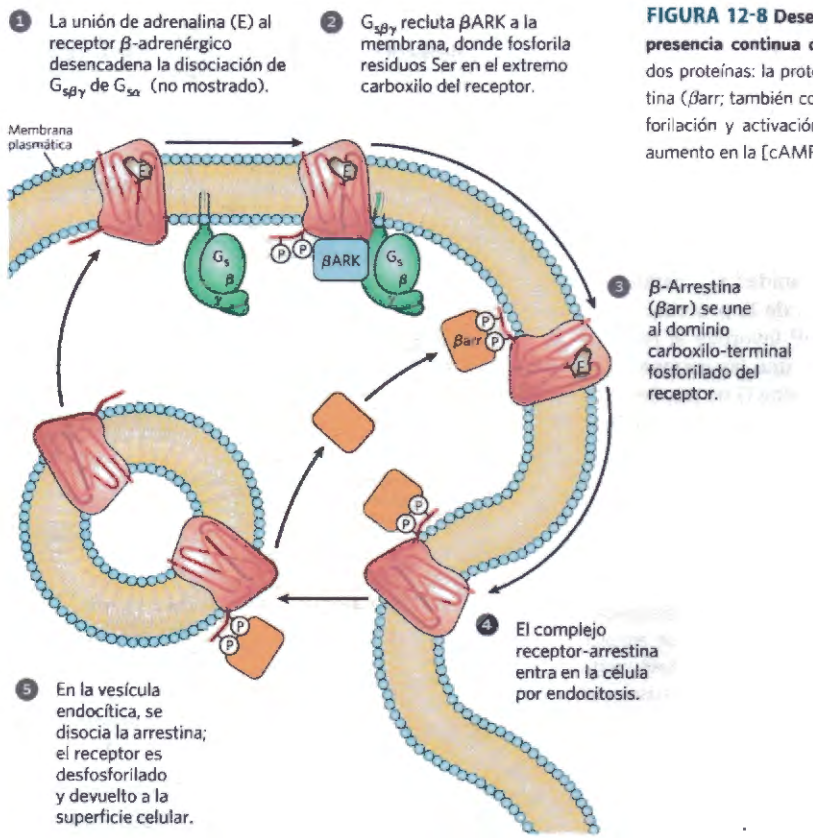


FIGURA 12-8 Desensibilización del receptor β-adrenérgico con la presencia continua de adrenalina. Este proceso está facilitado por dos proteínas: la proteína quinasa β-adrenérgica (βARK) y la β-arrestina (βarr; también conocida como arrestina 2). No se muestra la fosforilación y activación de βARK por PKA. La PKA se activa por un aumento en la [cAMP] en respuesta a la señal inicial, adrenalina.

este estado los receptores no son accesibles a la adrenalina y son, por tanto, inactivos. Estos receptores son finalmente desfosforilados y devueltos a la membrana plasmática, completando el circuito y resensibilizando el sistema a la adrenalina. La receptor β-adrenérgico quinasa es un miembro de una familia de **quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK),** todas las cuales fosforilan GPCR en sus dominios citoplásmicos carboxilo-terminales y juegan un papel similar al de las βARK en la desensibilización y resensibilización de sus receptores. Al menos cinco GRK y cuatro arrestinas diferentes están codificadas en el genoma humano; cada GRK puede desensibilizar un subconjunto particular de GPCR mientras que cada arrestina puede interaccionar con muchos tipos diferentes de receptores fosforilados.

El complejo receptor-arrestina tiene otro papel importante: inicia la señalización a través de una ruta diferente, la cascada MAPK descrita más adelante. Así, actuando sobre un único GPCR, la adrenalina activa dos rutas de señalización diferentes. Las dos rutas, una activada por la interacción del receptor con una proteína G y la otra por su interacción con la arrestina, pueden verse afectadas de manera diferencial por el agonista; en algunos casos, un agonista favorece la ruta de la proteína G y en otro la de la arrestina. Esta doble posibilidad tiene importancia en el desarrollo de medicaciones que actúen a través de GPCR. Por ejemplo, el más adictivo de los opiáceos de abuso actúa más fuertemente sobre la señalización por proteínas G que sobre arrestina. Una medicación opioide ideal actuaría a través de la rama de la ruta que tenga más efectos terapéuticos y no sobre la ruta que conduce a la adicción. ■

El AMP cíclico actúa como segundo mensajero para muchas moléculas reguladoras

La adrenalina es sólo una de las muchas hormonas, factores de crecimiento, y otras moléculas reguladoras que actúan gracias al cambio intracelular de [cAMP] y por lo tanto de la actividad de la PKA (Tabla 12-3). Por ejemplo, el glucagón se une a sus receptores en la membrana plasmática de los adipocitos, activando (vía una proteína G_s) la adenilil ciclasa. La PKA, estimulada como resultado del aumento de [cAMP], fosforila y activa dos proteínas clave para la movilización de los ácidos grasos de las grasas almacenadas (véase la Fig. 17-3). De la misma forma, la hormona peptídica ACTH (hormona adrenocorticotrópica, también conocida como corticotropina), producida en la hipófisis anterior, se une a receptores específicos en el córtex suprarrenal, activando la adenilil ciclasa y aumentando la [cAMP] intracelular. La PKA seguidamente fosforila y activa varios enzimas que se requieren para la síntesis de cortisol y otras hormonas esteroideas. En muchos tipos celulares la subunidad catalítica de la PKA también puede desplazarse al núcleo donde fosforila una **proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB)** que altera la expresión de genes específicos regulados por cAMP.

Algunas hormonas actúan *inhibiendo* la adenilil ciclasa, *disminuyendo* así los niveles de cAMP, y *suprimiendo* la fosforilación de proteínas. Por ejemplo, la unión de somatostatina a su receptor desencadena la activación de una **proteína G inhibidora**, o $\mathbf{G_i}$, estructuralmente homóloga a G_s, que inhibe la adenilil ciclasa y disminuye la [cAMP]. La somatostatina, por lo tanto, inhibe la secreción de varias hormonas, incluyendo el glucagón. En el tejido adiposo, la prostaglandina E_2 (PGE_2, véase la Fig. 10-17) inhibe la adenilil ciclasa, con lo que disminuye así la [cAMP] y se hace más lenta la movilización de las reservas lipídicas desencadenada por la adrenalina y el glucagón. En otros tejidos, la PGE_2 estimula la síntesis de cAMP: sus receptores están acoplados a la adenilil ciclasa a través de una proteína G estimuladora, G_s. En tejidos con receptores α_2-adrenér-

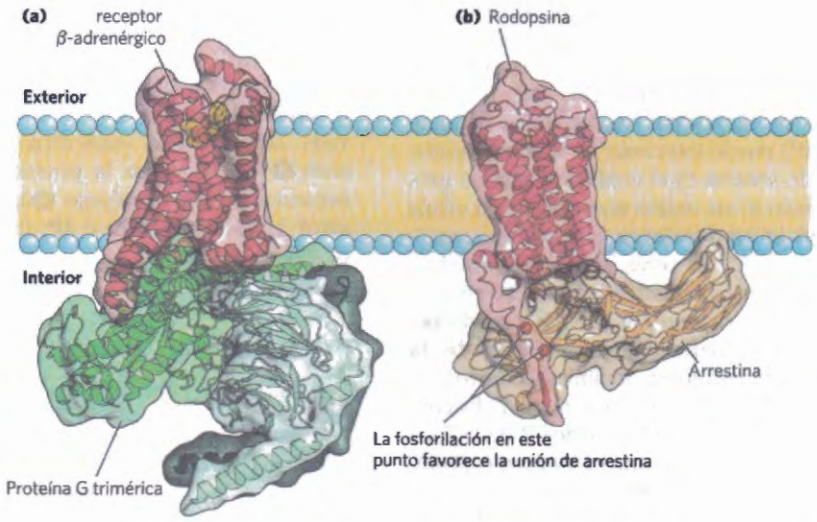


FIGURA 12-9 Exclusión mutua de la proteína G trimérica y la arrestina en su interacción con GPCR. **(a)** el complejo del receptor β-adrenérgico con su proteína G trimérica, G_s. **(b)** Todavía no se ha resuelto el complejo de la β-arrestina con el receptor β-adrenérgico; aquí se muestra el complejo resuelto con otro GPCR muy similar, la rodopsina visual. (La rodopsina se discute más adelante en este capítulo.) La comparación de las dos estructuras demuestra claramente que la unión de arrestina bloquea la unión de la proteína G, evitando la activación de las proteínas G y terminando de manera efectiva la respuesta a la señal inicial (adrenalina). [Fuentes: (a) PDB ID 3SN6, S.G.F. Rasmussen et al., *Nature* 477:549, 2011, Fig. 2c. (b) PDB ID 4ZWJ, Y. Kang et al., *Nature* 523:561, 2015, Fig. 2b.]

TABLA 12-3 Algunas señales que usan cAMP como segundo mensajero

Corticotropina (ACTH)
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Dopamina [D_1, D_2]
Adrenalina (β-adrenérgico)
Hormona estimuladora del folículo (FSH)
Glucagón
Histamina [H_2]
Hormona luteinizante (LH)
Hormona estimuladora del melanocito (MSH)
Sustancias olorosas (muchas)
Hormona paratiroidea
Prostaglandinas E_1, E_2 (PGE_1, PGE_2)
Serotonina [5-HT-1a, 5-HT-2]
Somatostatina
Saborizantes (dulce, amargo)
Hormona estimuladora del tiroides

Nota: Subtipos de receptores mostrados en corchetes. Los subtipos pueden tener diferentes mecanismos de transducción. Por ejemplo, la serotonina se detecta en algunos tejidos por los subtipos de receptores 5-HT_1 y 5-HT_4, que actúan a través de la adenilil ciclasa y cAMP, y en otros tejidos por un subtipo de receptor 5-HT_2, que actúa a través del mecanismo de la fosfolipasa C-IP_3 (véase la Tabla 12-4).

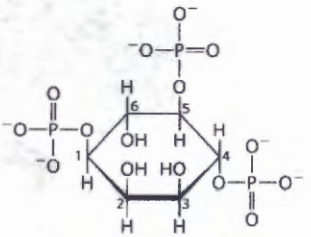
gicos, la adrenalina disminuye la [cAMP]; en este caso los receptores están acoplados a la adenilil ciclasa a través de una proteína G inhibidora, G_i. En resumen, una señal extracelular tal como la adrenalina o la PGE_1 puede tener efectos muy diferentes en los distintos tejidos o tipos celulares, en función de tres factores: el tipo de receptor en cada tejido, el tipo de proteína G (G_s o G_i) con la que está acoplado el receptor, y el conjunto de enzimas diana de la PKA en la célula. Al sumar las influencias que tienden a aumentar y disminuir la [cAMP], la célula consigue la integración de señales que indicamos como una característica general de los mecanismos de transducción de señales (Fig. 12-1e).

Otro factor que explica por qué un único segundo mensajero (cAMP) puede intervenir en la transducción de tantos tipos de señales es el confinamiento del proceso de señalización a una región específica de la célula mediante **proteínas adaptadoras**, proteínas no catalíticas que mantienen juntas otras moléculas proteicas que funcionan concertadamente (se describen con mayor detalle más adelante). Las **AKAP (A kinase anchoring proteins; proteínas de anclaje de la quinasa A)** poseen múltiples dominios distintos de unión a proteína; son proteínas adaptadoras polivalentes. Un dominio se une a las subunidades R de la PKA (véase la Fig. 12-6a) y la otra a una estructura específica dentro de la célula, que confina la PKA a la proximidad de tal estructura. Por ejemplo, existen AKAP específicas que unen la PKA a los microtúbulos, filamentos de actina, canales iónicos, mitocondrias o núcleos. Diferentes tipos de células tienen diferentes dotaciones de AKAP de modo que el cAMP podría estimular la fosforilación de proteínas mitocondriales en una célula y la fosforilación de los filamentos de actina en otra. En algunos casos, una AKAP conecta la PKA con el enzima que provoca la activación de la PKA (adenilil ciclasa) o termina la acción de la PKA (cAMP fosfodiesterasa o fosfoproteína fosfatasa) **(Fig. 12-10)**. La gran proximidad entre estos enzimas activadores e inactivadores consigue, probablemente, que la respuesta esté muy localizada y sea muy breve.

Actualmente está claro que para comprender completamente la señalización celular, los investigadores necesitan herramientas lo suficientemente precisas para poder detectar y estudiar los aspectos espacio-temporales de los procesos de señalización a nivel subcelular y en tiempo real. En estudios sobre la localización intracelular de los cambios bioquímicos, la bioquímica se encuentra con la biología celular, por lo que las técnicas que cruzan este límite se han convertido en esenciales para comprender las rutas de señalización. Las sondas fluorescentes han encontrado una gran aplicación en los estudios de señalización. El etiquetado de proteínas funcionales con una marca fluorescente tal como la proteína fluorescente verde (GFP) revela sus localizaciones subcelulares (véase la Fig. 9-16). Los cambios en el estado de asociación de dos proteínas (tales como las subunidades R y C de la PKA) pueden verse midiendo la transferencia no radiactiva de energía entre las sondas fluorescentes unidas a cada proteína, técnica que se denomina transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET; Recuadro 12-2).

Diacilglicerol, inositol trisfosfato y Ca^{2+} tienen papeles relacionados como segundos mensajeros

Una segunda y amplia clase de GPCR están acoplados a través de una proteína G a una **fosfolipasa C (PLC)** de la membrana plasmática que cataliza la rotura del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, o PIP_2 (véase la Fig. 10-15). Cuando una hormona que actúa según este mecanismo (Tabla 12-4) se une a su receptor específico en la membrana plasmática **(Fig. 12-11**, paso ❶), el complejo hormona-receptor cataliza el intercambio GTP-GDP en una proteína G asociada, $\mathbf{G_q}$ (paso ❷), activándola exactamente igual a como el receptor β-adrenérgico activa G_s (Fig. 12-4). A su vez, la G_q activada, activa la PLC específica para PIP_2 (Fig. 12-11, paso ❸) que cataliza la producción de dos potentes segundos mensajeros (paso ❹), **diacilglicerol** e **inositol 1,4,5-trisfosfato** o $\mathbf{IP_3}$ (no confundir con PIP_3, p. 463).



Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3)

El inositol trisfosfato, un producto hidrosoluble, difunde desde la membrana plasmática al retículo endoplasmático (RE), en donde se une a canales de Ca^{2+} específicos regulados por IP_3 provocando su apertura.

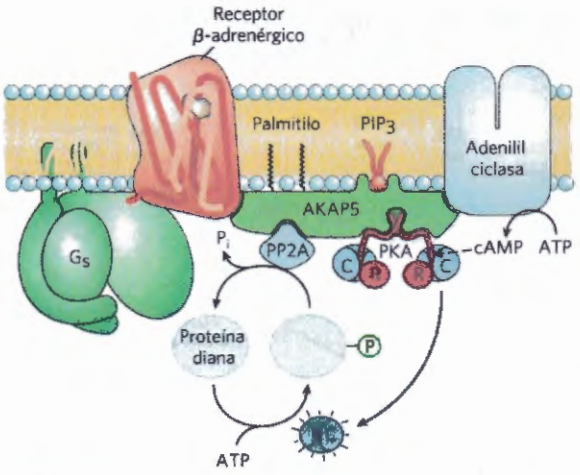


FIGURA 12-10 Nucleación de complejos supramoleculares por las proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAP). AKAP es una de una familia de proteínas que actúan como armazones multivalentes, manteniendo las subunidades catalíticas de la PKA, a través de la interacción de la AKAP con las subunidades reguladoras de la PKA, próximas a una región determinada de la célula. La AKAP5 es dirigida hacia balsas en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática mediante dos grupos palmitilo unidos covalentemente y un sitio que une fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3) en la membrana. AKAP también tiene sitios de unión para el receptor β-adrenérgico, adenilil ciclasa, PKA y una fosfoproteína fosfatasa (PP2A), manteniéndolos juntos en el plano de la membrana. Cuando la adrenalina se une al receptor β -adrenérgico, la $G_{s\alpha}$ activa la adenilil ciclasa que produce cAMP, el cual alcanza rápidamente la PKA próxima y, con muy poca dilución, la PKA fosforila su proteína diana alterando su actividad hasta que la fosfoproteína fosfatasa elimina el grupo fosforilo y devuelve la proteína diana a su estado preestímulo. Las AKAP en éste y otros casos provocan una elevada concentración de enzimas y segundos mensajeros, por lo que el circuito de señalización permanece altamente localizado y la duración de la señal es limitada.

La acción de la bomba SERCA (véase la p. 414) asegura que la $[Ca^{2+}]$ en el RE es órdenes de magnitud superior a la citosólica de manera que, cuando se abren los canales de Ca^{2+} regulados por compuerta, el Ca^{2+} fluye rápidamente hacia el citosol (Fig. 12-11, paso ❺) y la $[Ca^{2+}]$ citosólica aumenta abruptamente hasta aproximadamente 10^{-6} M. Un efecto de la $[Ca^{2+}]$ elevada es la activación de la **proteína quinasa C** (**PKC**; *C* por Ca^{2+}). El diacilglicerol coopera con el Ca^{2+} en la activación de la PKC por lo que también actúa como un segundo mensajero (paso ❻). La activación implica el desplazamiento de un dominio de la PKC (el dominio del pseudosustrato) lejos de su localización en la región de unión del sustrato del enzima, lo que permite que el enzima se una y fosforile proteínas que contienen una secuencia consenso de la PKC (residuos Ser o Thr incrustados en una secuencia de aminoácidos reconocida por la PKC (paso ❼). Hay varios isozimas de la PKC, cada uno con una distribución tisular característica, especificidad de proteínas diana, y función. Entre sus dianas se cuentan proteínas del citoesqueleto, enzimas y proteínas nucleares que regulan la expresión génica. Tomados en su conjunto esta familia de enzimas tiene una amplia gama de acciones celulares que afectan, por ejemplo, las funciones neuronal e inmune y la regulación de la división celular. Los compuestos que conducen a la sobreexpresión de PKC o aumentan su actividad a niveles anormales actúan como promotores tumorales; los animales expuestos a estas sustancias muestran una mayor tasa de cáncer.

El calcio es un segundo mensajero localizado en el espacio y en el tiempo

Existen muchas variaciones del esquema básico de la señalización por Ca^{2+}. En muchos tipos celulares que responden a señales extracelulares, el Ca^{2+} se utiliza como segundo mensajero que desencadena respuestas intracelulares, tales como la exocitosis en neuronas y células endocrinas, contracción muscular, o reordenamiento del citoesqueleto durante el movimiento ameboide. En células no estimuladas, la $[Ca^{2+}]$ citosólica se mantiene en un nivel muy bajo ($<10^{-7}$ M) por acción de las bombas de Ca^{2+} en el RE, mitocondria, y membrana plasmática (tal como se discute más adelante). Estímulos hormonales, neuronales, o de otro tipo provocan una entrada de Ca^{2+} al interior de la célula a través de canales específicos de Ca^{2+} en la membrana plasmática o liberan el Ca^{2+} retenido por el RE o la mitocondria; en ambos casos aumentan la $[Ca^{2+}]$ citosólica y desencadenan la respuesta celular.

Los cambios en la $[Ca^{2+}]$ intracelular son detectados por proteínas de unión de Ca^{2+} que regulan un conjunto de enzimas dependientes de Ca^{2+}. La **calmodulina** (**CaM**; M_r 17.000) es una proteína acídica con cuatro sitios de unión de Ca^{2+} de alta afinidad. Cuando la $[Ca^{2+}]$ intracelular alcanza valores de 10^{-6} M (1μ M), la unión del calcio a la calmodulina provoca un cambio de conformación en la proteína **(Fig. 12-12a)**. La calmodulina se asocia con una gran variedad de proteínas y, en su estado unido al Ca^{2+}, modula sus actividades (Fig.

TABLA 12-4 Algunas señales que actúan a través de la fosfolipasa C, IP_3 y Ca^{2+}

Acetilcolina [muscarínico M_1]	Péptido liberador de gastrina	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
Agonistas α_1-adrenérgicos	Glutamato	Serotonina [5-HT-1c]
Angiogenina	Hormona liberadora de g onadotropina (GRH)	Hormona liberadora de Tirotropina (TRH)
Angiotensina II	Histamina [H_1]	Vasopresina
ATP [P_{2x} y P_{2y}]	Luz (Drosophila)	
Auxina	Oxitocina	

Nota: Los subtipos de receptores están entre corchetes; véase la nota al pie de la Tabla 12-3.

RECUADRO 12-2 MÉTODOS Bioquímica visualizada en una célula viva

Las sondas fluorescentes se utilizan habitualmente para detectar cambios bioquímicos rápidos en células vivas individuales. Se pueden diseñar para que den una información prácticamente instantánea (en nanosegundos) sobre los cambios en la concentración intracelular de un segundo mensajero o en la actividad de una proteína quinasa. Además, la microscopia de fluorescencia tiene suficiente resolución para indicar en qué parte de la célula tienen lugar tales cambios. En un procedimiento muy utilizado, las sondas fluorescentes son sustancias derivadas de una proteína fluorescente natural, la **proteína fluorescente verde (GFP)** descrita en el Capítulo 9 (véase la Fig. 9-16), y de variantes con diferentes espectros de fluorescencia, producidas mediante ingeniería genética u obtenidas a partir de diversos celentéreos marinos. Por ejemplo, en la proteína fluorescente amarilla (YFP), Ala^{206} de GFP se reemplaza por un residuo Lys lo que hace variar la longitud de onda de absorción de la luz y la fluorescencia. Otras variantes de la GFP tienen fluorescencia azul (BFP) o púrpura (CFP) mientras que una proteína relacionada (mRFP1) da una fluorescencia roja (Fig. 1). GFP y sus variantes son estructuras compactas que retienen su capacidad de plegarse en su conformación nativa de barril β incluso fusionadas con otra proteína. Se están utilizando estas proteínas fluorescentes híbridas como reglas espectroscópicas para medir distancias entre proteínas que interaccionan dentro de una célula e, indirectamente, para medir concentraciones locales de compuestos que modifican la distancia entre dos proteínas.

Una molécula fluorescente excitada, tal como GFP o YFP, puede utilizar la energía del fotón absorbido de dos maneras: (1) por fluorescencia, emitiendo un fotón

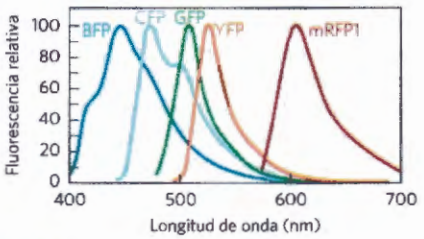


FIGURA 1 Espectro de emisión de variantes de GFP

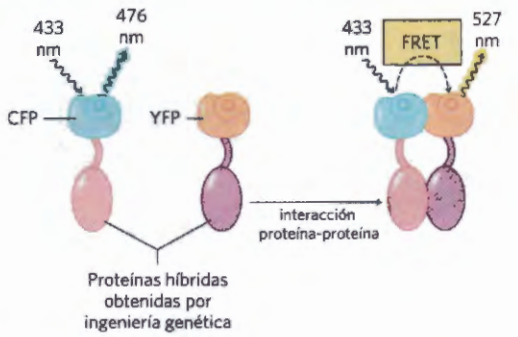


FIGURA 2 Cuando la proteína dadora (CFP) se excita con luz monocromática de longitud de onda 433 nm, emite luz fluorescente a 476 nm (izquierda). Cuando la proteína (rojo) fusionada con CFP interacciona con la proteína fusionada con YFP (púrpura), esa interacción acerca lo suficiente CFP e YFP para que sea posible la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre ellas. Ahora bien, cuando CFP absorbe luz de 433 nm, en lugar de emitir fluorescencia a 476 nm, transfiere la energía directamente a YFP que entonces emite fluorescencia a su longitud de onda de emisión característica, 527 nm. La razón entre la emisión de luz a 527 y 476 nm es, por tanto, una medida de la interacción de la proteína roja y la púrpura.

de longitud de onda ligeramente superior (menor energía) que la de la luz excitante, o (2) por **transferencia de energía de resonancia fluorescente** (fluorescence resonance energy transfer: **FRET**) no radiactiva, en la que la energía de la molécula excitada (el dador) pasa directamente a una molécula próxima (el aceptor) *sin emisión de un fotón*, excitando el aceptor (Fig. 2). El aceptor puede ahora decaer a su estado basal por fluorescencia; el fotón emitido tiene una longitud de onda mayor (menor energía) que la luz de excitación original y que la emisión de fluorescencia del dador. Este segundo modo de decaimiento (FRET) sólo es posible cuando el dador y el aceptor están próximos (entre 1 y 50 Å); la eficiencia de la FRET es inversamente proporcional a la *sexta potencia* de la distancia entre el dador y el aceptor. Así, variaciones muy pequeñas en la distancia entre dador y aceptor se manifiestan como grandes variaciones de FRET, medida como la fluorescencia de la molécula aceptora cuando se excita el dador. Con detectores de luz suficientemente sensibles esta señal de fluorescencia puede localizarse en regiones específicas de una célula viva individual.

12-12b). La calmodulina es un miembro de una familia de proteínas que unen Ca^{2+} entre las que también se encuentra la troponina (véase la Fig. 5-32) que provoca la contracción del músculo esquelético como respuesta al aumento de la $[Ca^{2+}]$. Esta familia comparte una característica de la estructura de fijación de Ca^{2+}: la mano EF (Fig. 12-12c).

La calmodulina es una subunidad integral de las **proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM quinasas** tipos I a IV). Cuando la $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta en respuesta a un estímulo, la calmodulina une Ca^{2+}, experimenta un cambio en la conformación, y activa la CaM quinasa. La quinasa fosforila entonces un grupo de enzimas diana, regulando sus actividades. La calmodulina es también una subunidad reguladora de la fosforilasa *b* quinasa de músculo, que se activa por Ca^{2+}. Así el Ca^{2+} desencadena las contracciones del músculo que requieren ATP mientras activa al mismo tiempo la degradación del glucógeno, lo que proporciona combustible para la síntesis de ATP. Se conocen otros muchos enzimas que también están modulados por Ca^{2+} a través de la calmodulina. (Tabla

Se ha utilizado la FRET para medir la [cAMP] en células vivas. El gen de la GFP se fusiona con el de la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) mientras que el gen de la BFP se fusiona con el de la subunidad catalítica (C) (Fig. 3). Cuando se expresan estas dos proteínas híbridas en una célula, BFP (dador; excitación a 380 nm; excitación a 460 nm) y GFP (aceptor; excitación a 475 nm; emisión a 545 nm) en la PKA inactiva (tetrámero R_2C_2) están suficientemente cerca para experimentar FRET. Dondequiera en la célula que aumente la [cAMP], el complejo R_2C_2 se disocia en R_2 y 2C perdiéndose la señal FRET ya que dador y aceptor están ahora demasiado alejados para que FRET sea eficiente. Vista al microscopio de fluorescencia, la región de [cAMP] más elevada tiene una señal de GFP mínima y una señal más elevada de BFP. La determinación de la razón de emisión a 460 nm y 545 nm da una medida sensible del cambio en la [cAMP]. Determinando esta razón en todas las regiones de la célula se puede generar una imagen de color falso de la célula en la que la razón, o [cAMP] relativa, se representa por la intensidad del color. Imágenes registradas a intervalos de tiempo determinados ponen de manifiesto los cambios en la [cAMP] en función del tiempo.

Se ha utilizado una variante de esta tecnología para medir la actividad de la PKA en una célula viva (Fig. 4). Se ha creado una diana de fosforilación para la PKA mediante la producción de una proteína híbrida que contiene cuatro elementos: YFP (aceptor); un péptido corto con un residuo Ser rodeado por la secuencia consenso para la PKA; un dominio de unión de Ⓟ-Ser (denominado 14-3-3) y CFP (dador). Cuando el residuo de Ser no está fosforilado, 14-3-3 no tiene afinidad por el residuo Ser por lo que la proteína híbrida se encuentra en la forma extendida, con el dador y el aceptor demasiado alejados para generar una señal FRET. En el lugar de la célula en el que la PKA es activa fosforila el residuo Ser de la proteína híbrida con lo que 14-3-3 se une a Ⓟ-Ser. En esta operación YFP y CFP se acercan entre sí con lo que se detecta una señal FRET con el microscopio de fluorescencia que revela la presencia de PKA activa.

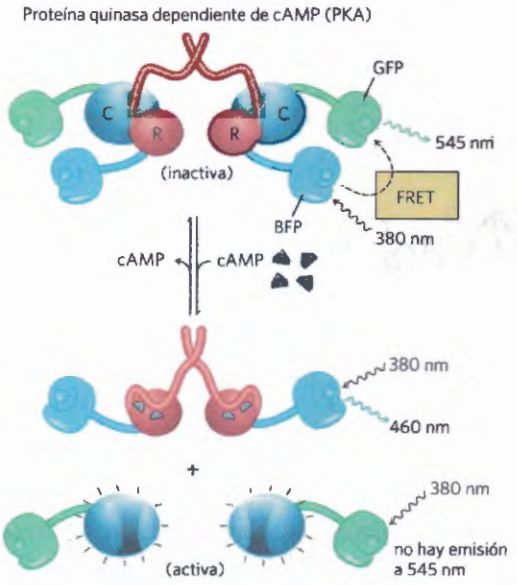


FIGURA 3 Determinación de la [cAMP] con FRET. La fusión génica crea proteínas híbridas que muestran FRET cuando las subunidades reguladoras (R) y catalíticas (C) de la PKA están asociadas (baja [cAMP]). Cuando aumenta [cAMP], las subunidades se disocian por lo que cesa la FRET. La razón de la emisión a 460 nm (disociada) y 545 nm (unidas) ofrece así una medida sensible de la [cAMP].

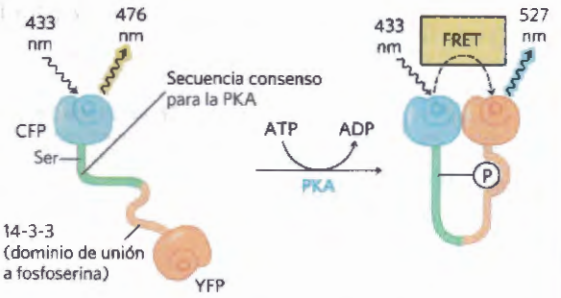


FIGURA 4 Determinación de la actividad de la PKA con FRET. Una proteína obtenida por ingeniería genética une YFP y CFP a través de un péptido que contiene un residuo Ser rodeado por la secuencia consenso de fosforilación por la PKA, y el dominio 14-3-3 de unión a Ⓟ-Ser. La PKA activa fosforila el residuo Ser que se acopla con el dominio de unión 14-3-3 situando las proteínas fluorescentes suficientemente cerca para permitir la existencia de FRET que revela la presencia de PKA activa.

12-5). La actividad del segundo mensajero Ca^{2+}, al igual que la del cAMP, puede estar restringida en el espacio; después de que su liberación provoque una respuesta local, se elimina el Ca^{2+} generalmente antes de que pueda difundir a partes distantes de la célula.

Muy frecuentemente, la [Ca^{2+}] no sólo sube y a continuación decae sino que oscila en períodos de varios segundos **(Fig. 12-13)**, incluso cuando la concentración extracelular de la hormona desencadenante permanece constante. En el mecanismo según el cual se producen las oscilaciones de la [Ca^{2+}] interviene probablemente una regulación por retroalimentación del Ca^{2+} sobre alguna parte del proceso de liberación de Ca^{2+}. Cualquiera que sea el mecanismo, el efecto es que una clase de señal (concentración de hormona, por ejemplo) se convierte en otra (frecuencia y amplitud de "picos" de la [Ca^{2+}] intracelular). La señal de Ca^{2+} disminuye a medida que el Ca^{2+} difunde alejándose de la fuente inicial (el canal de Ca^{2+}), es secuestrado en el RE o se bombea fuera de la célula.

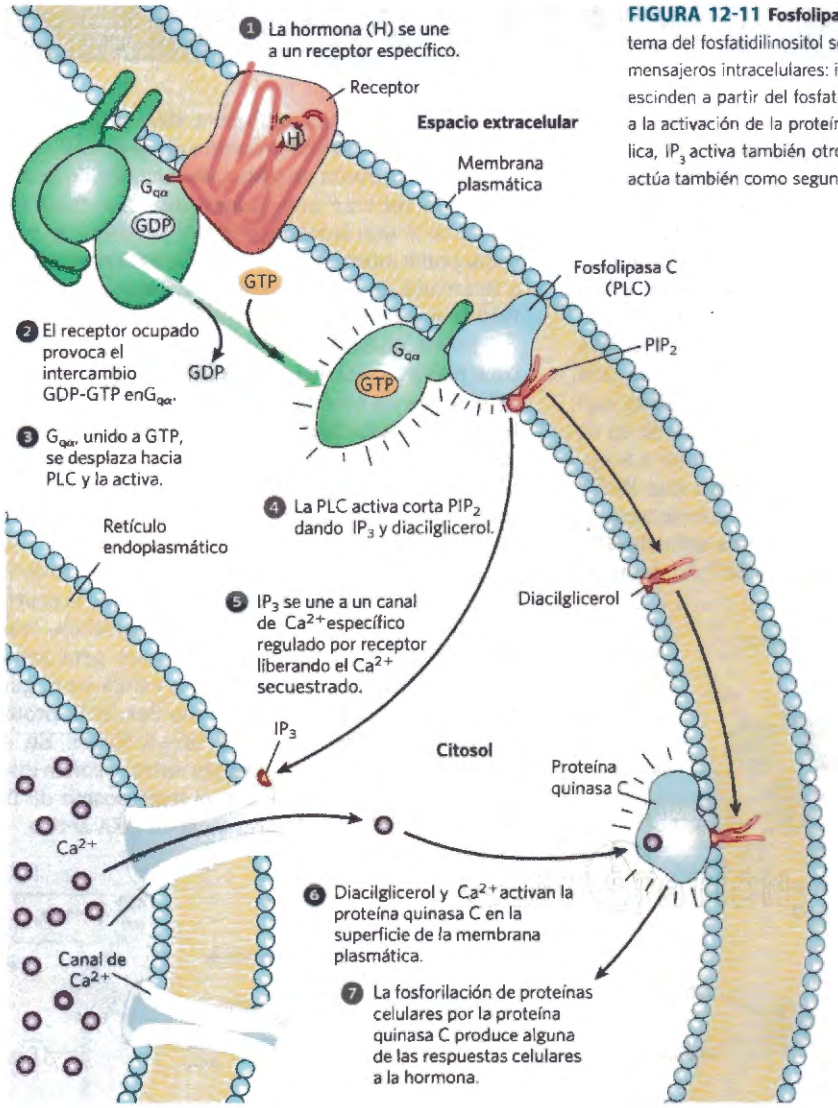


FIGURA 12-11 Fosfolipasa C activada por hormona e IP_3. En el sistema del fosfatidilinositol sensible a hormona se producen dos segundos mensajeros intracelulares: inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol se escinden a partir del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Ambos contribuyen a la activación de la proteína quinasa C. Al incrementar la $[Ca^{2+}]$ citosólica, IP_3 activa también otros enzimas dependientes de Ca^{2+}; así el Ca^{2+} actúa también como segundo mensajero.

Hay un intercambio de mensajes significativo entre los sistemas de señalización por Ca^{2+} y por cAMP. En algunos tejidos, tanto el enzima que produce cAMP (adenilil ciclasa) como el que lo degrada (fosfodiesterasa) son estimulados por Ca^{2+}. Los cambios temporales y espaciales de la $[Ca^{2+}]$ pueden, por tanto, producir cambios transitorios y localizados en la [cAMP]. Ya hemos mencionado anteriormente que la PKA, el enzima que responde a cAMP, es a menudo parte de un complejo supramolecular muy localizado que se forma sobre proteínas armazón tales como las AKAP. Esta localización subcelular de los enzimas diana, combinada con los gradientes temporales y espaciales de la $[Ca^{2+}]$ y de [cAMP], permiten que la célula responda a una o varias señales con cambios metabólicos sutilmente acompasados y localizados en el espacio y en el tiempo.

RESUMEN 12.2 Receptores acoplados a proteínas G y segundos mensajeros

- Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) comparten un ordenamiento estructural común de siete hélices transmembrana y actúan a través de proteínas G homotriméricas. Al unir el ligando los GPCR catalizan el intercambio de GTP por GDP en la proteína G forzando la disociación de la subunidad G_α; a continuación G_α estimula o inhibe la actividad de un enzima efector, cambiando la concentración de su producto el segundo mensajero.
- El receptor β-adrenérgico, activa una proteína G estimuladora, G_s, que activa así la adenilil ciclasa y aumenta la concentración del segundo mensajero cAMP. El cAMP estimula la proteína quinasa dependiente de cAMP que fosforila enzimas clave cambiando sus actividades.
- Cascadas enzimáticas, en las que una única molécula de hormona activa un catalizador que, a su vez, activa otro catalizador y así sucesivamente, da como resultado una gran amplificación de la señal; esto es característico de los sistemas receptores de hormonas.
- La concentración de AMP cíclico es reducida por la cAMP fosfodiesterasa y G_s se hace inactivo por hidrólisis de su GTP unido a GDP actuando como un conmutador binario auto-limitante.
- Cuando persiste la señal de la adrenalina, la proteína quinasa específica del receptor β-adrenérgico y la

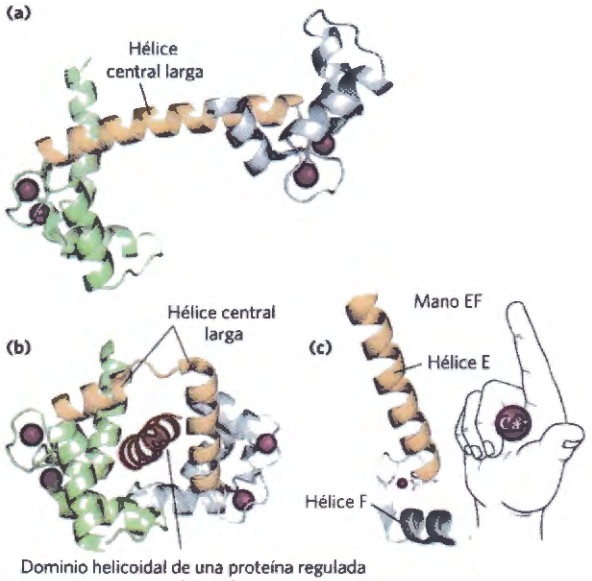


FIGURA 12-12 Calmodulina. Ésta es la proteína que interviene en muchas reacciones enzimáticas estimuladas por Ca^{2+}. La calmodulina tiene cuatro sitios de unión de Ca^{2+} de elevada afinidad (K_d alrededor de 0,1 a 1 μM). **(a)** Modelo de cintas de la estructura cristalina de la calmodulina (PDB ID 1CLL). Los cuatro sitios de unión de Ca^{2+} están ocupados por Ca^{2+} (púrpura). El dominio amino-terminal está a la izquierda; el carboxilo-terminal a la derecha. **(b)** La calmodulina asociada con un dominio helicoidal (rojo) de uno de los muchos enzimas que regula, la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (PDB ID 1CDL). Obsérvese que la larga hélice α central de la calmodulina visible en (a) se ha doblado sobre sí misma al unirse al dominio helicoidal del sustrato. La hélice central de la calmodulina es claramente más flexible en solución que en el cristal. **(c)** Cada uno de los cuatro sitios de unión de Ca^{2+} se sitúa en un motivo hélice-lazo-hélice denominado mano EF que también se encuentra en otras muchas proteínas fijadoras de Ca^{2+}. [Fuentes: (a) PDB ID 1CLL, R. Chattopadhyaya et al., *J. Mol. Biol.* 228:1177, 1992. (b, c) PDB ID 1CDL, W.E. Meador et al., *Science* 257:1251, 1992.]

TABLA 12-5 Algunas proteínas reguladas por Ca^{2+} y calmodulina

Adenilil ciclasa (cerebro)
Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} / calmodulina (CaM quinasas I a IV)
Canal de Na^+ dependiente de Ca^{2+} (*Paramecium*)
Canal liberador de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático
Calcineurina (fosfoproteína fosfatasa 2B)
cAMP fosfodiesterasa
Canal olfativo de entrada regulada por cAMP
Canales de Na^+ y Ca^{2+} de entrada regulada por cGMP (bastones y conos)
Glutamato descarboxilasa
Quinasas de la cadena ligera de miosina
NAD^+ quinasa
Óxido nítrico sintasa
Fosfatidilinositol 3-quinasa
Ca^{2+} ATPasa (bomba de Ca^{2+}) de la membrana plasmática
RNA helicasa

β-arrestina desensibilizan temporalmente el receptor y provocan su transporte a vesículas intracelulares.

Algunos receptores *estimulan* la adenilil ciclasa a través de G_s; otros la *inhiben* a través de G_i. Así la [cAMP] celular refleja el entrada coordinada de dos (o más) señales.

■ Proteínas adaptadoras no catalíticas tales como las AKAP mantienen juntas las proteínas que intervienen en un proceso de señalización, aumentando la eficiencia de sus interacciones y, en algunos casos, confinando el proceso a una localización subcelular específica.

■ Algunos GPCR actúan a través de una fosfolipasa C de la membrana plasmática que rompe el PIP_2 en diacilglicerol e IP_3. El IP_3 aumenta la $[Ca^{2+}]$ en el citosol gracias a la apertura de los canales de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático. El Ca^{2+} junto con el diacilglicerol activa la proteína quinasa C que fosforila y cambia la actividad de proteínas celulares específicas. La $[Ca^{2+}]$ celular tam-

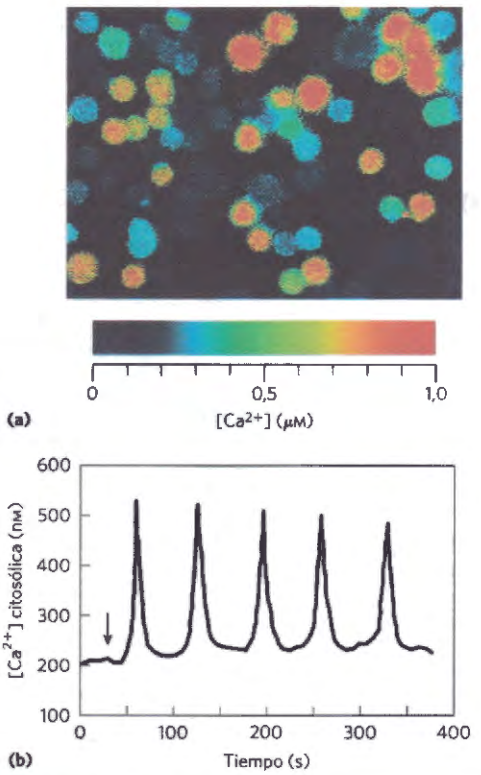


FIGURA 12-13 Desencadenamiento de oscilaciones en $[Ca^{2+}]$ intracelular por señales extracelulares. (a) Se deja que un colorante (fura) cuya fluorescencia cambia cuando une Ca^{2+} difunda dentro de las células, y su producción instantánea de luz es medida por microscopia de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se representa por el color; la escala de color relaciona intensidad de color con $[Ca^{2+}]$, lo que permite determinar la $[Ca^{2+}]$ absoluta. En este caso, los timocitos (células del timo) se han estimulado con ATP extracelular, que incrementa su $[Ca^{2+}]$ interna. Las células son heterogéneas en sus respuestas; algunas tienen una $[Ca^{2+}]$ intracelular elevada (rojo), otras mucho más baja (azul). **(b)** Cuando dicha sonda se usa en un hepatocito aislado, se observa que el agonista noradrenalina (añadido en la flecha) provoca oscilaciones de $[Ca^{2+}]$ desde 200 a 500 nM. Oscilaciones similares son inducidas en otras tipos celulares por otras señales extracelulares. [Fuentes: (a) Cortesía de Michael D. Cahalan, Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine. (b) T.A. Rooney et al., *J. Biol. Chem.* 264:17,131, 1989.]

bién regula (a menudo a través de la calmodulina) otros muchos enzimas y proteínas que intervienen en la secreción, reordenamientos del citoesqueleto o en la contracción.

12.3 GPCR en la visión, el olfato y el gusto

La detección de la luz, los olores, y los sabores (vista, olfato y gusto, respectivamente) en animales se lleva a cabo por neuronas sensoriales especializadas que utilizan mecanismos de transducción de señal similares, en general, a los utilizados para detectar hormonas, neurotransmisores, y factores de crecimiento. Una señal sensorial inicial se amplifica a gran escala gracias a mecanismos en los que intervienen canales iónicos de entrada regulada y segundos mensajeros intracelulares; el sistema se adapta a la estimulación continua mediante cambios en la sensibilidad a los estímulos (desensibilización); la entrada sensorial a partir de varios receptores se integra antes de que la señal final llegue al cerebro.

El ojo de vertebrados utiliza mecanismos GPCR clásicos

La transducción visual **(Fig. 12-14)** comienza cuando la luz incide sobre la **rodopsina**, un GPCR de la membrana del disco de los bastones del ojo de vertebrados. (Los bastones no detectan colores; los conos sí lo hacen (véase más adelante).) El pigmento que absorbe la luz (cromóforo) 11-*cis*-retinal está unido covalentemente a la **opsina**, el componente proteico de la rodopsina, que se encuentra cerca del centro de la bicapa de la membrana de disco. Cuando el componente retinal de la rodopsina absorbe un fotón (paso ❶), la energía provoca un cambio fotoquímico; el 11-*cis*-retinal se convierte en todo-*trans*-retinal (véanse las Figs. 1-20b y 10-20). Este cambio en la estructura del cromóforo provoca cambios de conformación en la molécula de rodopsina, haciendo que interaccione con su proteína G trimérica transducina, activándola. A continuación la rodopsina estimula el intercambio del GDP unido a la transducina por GTP procedente del citosol (Fig. 12-14, paso ❷), y la transducina activada estimula la proteína de membrana fosfodiesterasa de GMP cíclico (cGMP PDE), eliminando una subunidad inhibidora (paso ❸). La cGMP PDE activada degrada el segundo mensajero 3',5'-cGMP a 5'-GMP, disminuyendo la concentración de cGMP

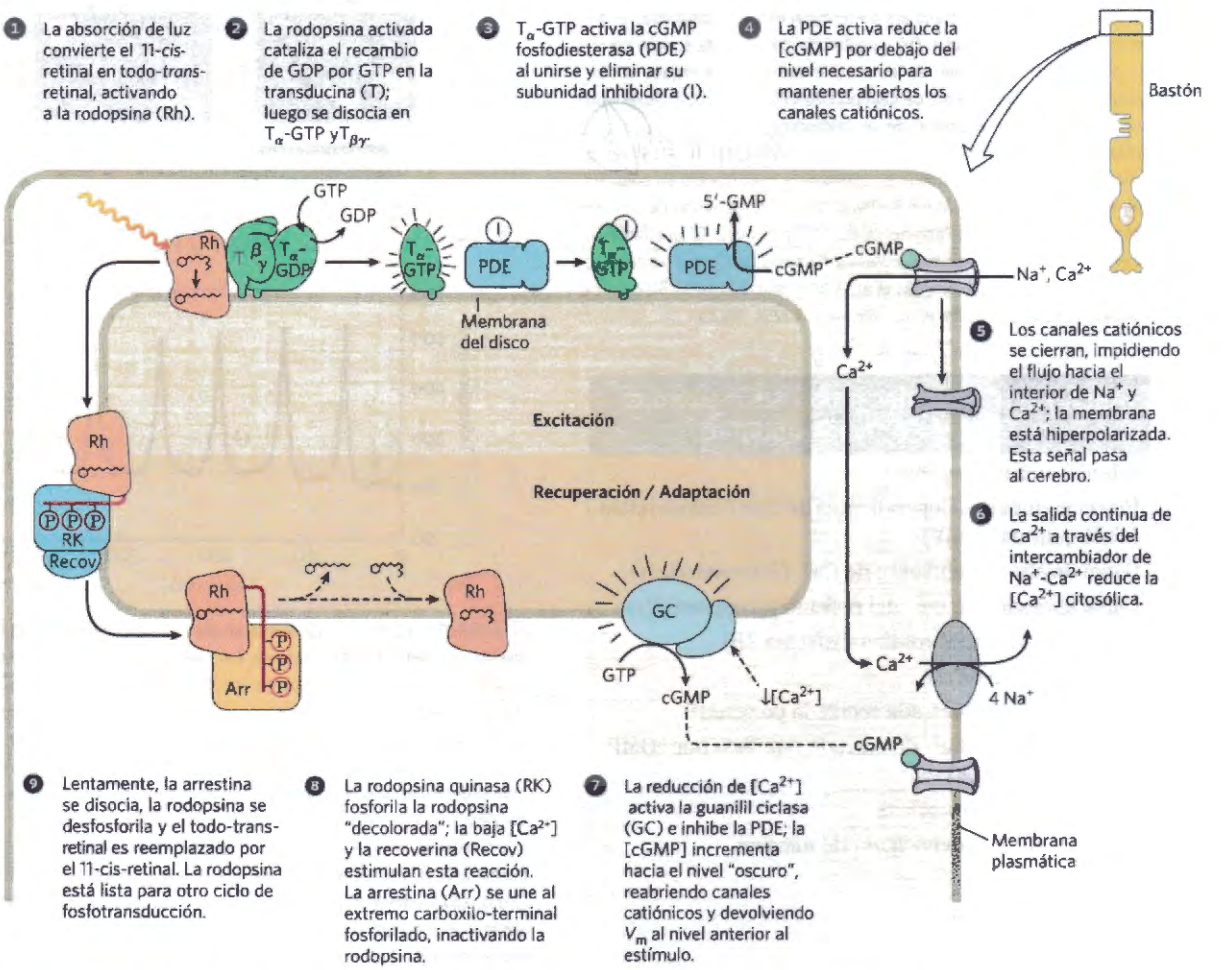


FIGURA 12-14 Consecuencias moleculares de la absorción de fotones por la rodopsina en el segmento externo de los bastones. La mitad superior de la figura (etapas de la ❶ a la ❺) describe la excitación; la inferior, la recuperación y adaptación después de la iluminación; recuperación (etapas de la ❻ y ❼) y adaptación (etapas ❽ y ❾).

(paso ❹). Un canal de Na^+ o de Ca^{2+} dependiente de cGMP de la membrana plasmática se cierra (paso ❺), mientras que un antiportador Na^+-Ca^{2+} activo continua bombeando Ca^{2+} hacia el exterior a través de la membrana plasmática (paso ❻), haciendo que el potencial transmembrana sea más negativo en el interior (es decir, hiperpolarizando el bastón). Este cambio eléctrico pasa a través de una serie de células nerviosas especializadas hacia la corteza visual del cerebro.

Varios pasos en el proceso de la transducción visual dan lugar a una gran amplificación de la señal. Cada molécula de rodopsina excitada activa al menos 500 moléculas de transducina, cada una de las cuales puede activar una molécula de cGMP PDE. Esta fosfodiesterasa tiene un número de recambio notablemente elevado, de tal modo que cada molécula activada hidroliza 4.200 moléculas de cGMP por segundo. La unión del cGMP a canales iónicos de compuerta regulada por cGMP es cooperativa, por lo que una variación relativamente pequeña de la [cGMP] da como resultado un gran cambio en la conductancia iónica. El resultado de estas amplificaciones es una sensibilidad exquisita a la luz. La absorción de un simple fotón, cierra 1.000 o más canales iónicos de Na^+ y Ca^{2+}, hiperpolarizando el potencial de membrana de la célula (V_m) en aproximadamente 1mV.

A medida que sus ojos se desplazan a lo largo de esta línea, las imágenes retinales de las primeras palabras desaparecen rápidamente, antes de que vea la siguiente serie de palabras. En este corto intervalo, ha tenido lugar una gran cantidad de bioquímica. Muy poco después de que cese la iluminación de los bastones o conos, se apaga el sistema fotosensor. La subunidad α de la transducina (T_α, con el GTP unido) tiene una actividad GTPasa intrínseca. En unos milisegundos después de que disminuya la intensidad de la luz, se hidroliza el GTP y la T_α se reasocia con la $T_{\beta\gamma}$. La subunidad inhibidora de la PDE, que había estado unida a T_α-GTP, se libera y se reasocia con la PDE, inhibiendo fuertemente su actividad y desacelerando la degradación de cGMP.

Al mismo tiempo, un segundo factor que ayuda a terminar la respuesta a la luz es la reducción de la [Ca^{2+}] intracelular que se produce como resultado del continuo bombeo hacia el exterior de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+-Ca^{2+} (Fig. 12-14, paso ❻). Una elevada [Ca^{2+}] inhibe el enzima que sintetiza cGMP (guanilil ciclasa, paso ❼), de modo que la producción de cGMP aumenta cuando disminuye la [Ca^{2+}], llegando rápidamente a los niveles anteriores al estímulo.

En respuesta a una iluminación prolongada, la propia rodopsina experimenta cambios que limitan la duración de su actividad señalizadora. El cambio de conformación inducido por la absorción de la luz en la rodopsina expone varios residuos Thr y Ser en el dominio carboxilo-terminal, que se fosforilan rápidamente gracias a la **rodopsina quinasa** (paso ❽ en la Fig. 12-39), que es funcional y estructuralmente homóloga a la quinasa β-adrenérgica (βARK) que desensibiliza el receptor β-adrenérgico. El dominio carboxilo-terminal fosforilado de la rodopsina se une a la proteína **arrestina 1**, impidiendo que continúe la interacción entre la rodopsina activada y la transducina. La arrestina 1 es homóloga cercana de la arrestina 2 (*b*arr) del sistema β-adrenérgico. En una escala de tiempo mucho más larga ((paso ❾), el todo-*trans*-retinal unido a una molécula de rodopsina excitada es eliminado y reemplazado por 11-*cis*-retinal, dejando la rodopsina lista para la detección de otro fotón.

La visión en color utiliza una ruta de transducción sensorial en los conos que es esencialmente idéntica a la descrita para los bastones pero que es desencadenada por receptores luminosos ligeramente diferentes. Existen tres tipos de conos especializados en la detección de la luz de diferentes regiones del espectro, que utilizan tres proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada cono expresa sólo una clase de opsina, pero cada tipo está estrechamente relacionado con la rodopsina en tamaño, secuencia de aminoácidos y, seguramente, en estructura tridimensional. Las diferencias entre las opsinas son, sin embargo, lo suficientemente grandes para situar el cromóforo, 11-*cis*-retinal, en tres ambientes ligeramente diferentes, con el resultado de que los tres fotorreceptores tienen diferentes espectros de absorción **(Fig. 12-15)**. Nosotros discriminamos los colores y las tonalidades gracias a la integración de las señales de entrada de los tres tipos de conos, cada uno de los cuales contiene uno de los tres fotorreceptores.

La ceguera para los colores, tal como la incapacidad de distinguir el rojo del verde, es un rasgo hereditario bastante común en humanos. Los tipos diferentes de ceguera para los colores son el resultado de diferentes mutaciones de las opsinas. Una forma es debida a la pérdida del fotorreceptor rojo; los individuos afectados se conocen como **dicromáticos rojos** (sólo pueden ver dos colores primarios). Otros carecen del pigmento verde y son **dicromáticos verdes**. En algunos casos, los fotorreceptores rojo y verde están presentes pero tienen la secuencia de aminoácidos cambiada lo que provoca un cambo en su espectro de absorción y, en consecuencia, una visión con color anormal. Según sea el pigmento alterado, tales individuos se denominan

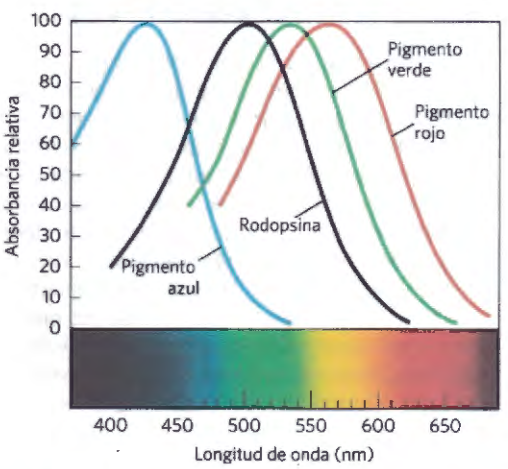


FIGURA 12-15 Espectro de absorción de rodopsina purificada y de los receptores rojo, verde y azul de los conos. El espectro, obtenido de conos individuales aislados de cadáveres, presenta picos alrededor de 420, 530 y 560 nm, mientras que el máximo de absorción para la rodopsina está sobre unos 500 nm. Como referencia, el espectro visible para los humanos está entre unos 380 y 750 nm. [Fuente: Datos procedentes de J. Nathans, *Sci. Am.* 260 (Febrero):42, 1989.]

tricromáticos anómalos rojos o **tricromáticos anómalos verdes**. El examen de los genes de los receptores visuales ha permitido el diagnóstico de ceguera para el color en un "paciente" famoso ¡más de un siglo después de su muerte! (Recuadro 12-3). ■

El olfato y el gusto en vertebrados utilizan mecanismos similares al sistema visual

Las células sensoriales utilizadas para detectar olores y sabores tienen mucho en común con el sistema receptor visual. La unión de una molécula olorosa a su GPCR induce un cambio en la conformación del receptor, activando una proteína G, G_{olf}, análoga a la transducina i a la G_s del sistema β-adrenérgico. La G_{olf} activada activa la adenilil ciclasa, elevando la [cAMP] local. Los canales de compuerta de Na^+ y Ca^{2+} regulados por cAMP de la membrana plasmática se abren, y el flujo hacia el interior de Na^+ y Ca^{2+} produce una pequeña despolarización llamada **potencial de receptor**. Si se unen suficientes moléculas olorosas a receptores, el potencial de receptor es lo suficientemente fuerte como para hacer que la neurona dispare un potencial de acción. Esto se traslada al cerebro en varios pasos y se registra como un olor específico. Todos estos acontecimientos tienen lugar en 100 a 200 ms. Cuando el estímulo olfativo ya no está presente la maquinaria de transducción se autoanula de diversas maneras. Una cAMP fosfodiesterasa devuelve la [cAMP] a los niveles preestímulo. G_{olf} hidroliza su GTP unido a GDP, inactivándose a sí misma. La fosforilación del receptor por una quinasa específica impide su interacción con G_{olf} mediante un mecanismo análogo al usado para desensibilizar el receptor β-adrenérgico y la rodopsina. Algunas sustancias olorosas son detectadas por un mecanismo que hemos visto en otras transducciones de señal: activación de una fosfolipasa y producción de IP_3, que conlleva un aumento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular.

El sentido del gusto en los vertebrados refleja la actividad de neuronas gustativas agrupadas en las papilas gustativas de la superficie de la lengua. Por ejemplo, las moléculas de sabor dulce son las que se unen a receptores de las papillas gustativas "dulces". En las neuronas sensoriales del gusto, los GPCR están acoplados a la proteína G heterotrimérica **gustducina**. Cuando la molécula saborizante se une al receptor, la gustducina se activa y estimula la producción de cAMP a cargo de la adenilil ciclasa. El aumento resultante de la [cAMP] activa la PKA que fosforila canales de K^+ de la membrana plasmática, cerrándolos, y enviando una señal eléctrica al cerebro. Otras papilas gustativas especializadas en la detección del sabor amargo, agrio, salado o umami utilizan diversas combinaciones de segundos mensajeros y de canales iónicos en los mecanismos de transducción.

Todos los sistemas GPCR comparten características universales

Hemos visto varios sistemas de señalización (hormonal, vista, olfato y gusto) en los que los receptores de membrana están acoplados a través de proteínas G a enzimas que generan segundos mensajeros. Tal como hemos sugerido, los mecanismos de señalización deben haber surgido en los comienzos de la evolución; estudios genómicos muestran la presencia de centenares de genes que codifican GPCR, en vertebrados, artrópodos (*Drosophila* y mosquito) y en el gusano *Caenorhabditis elegans*. Incluso la levadura de panificación común *Saccharomyces* utiliza GPCR y proteínas G para detectar el tipo opuesto para el apareamiento. Los patrones generales se han conservado, mientras que la introduc-

RECUADRO 12-3 MEDICINA Daltonismo: Experimento de John Dalton desde la tumba

El químico John Dalton (famoso por la teoría atómica) tenía ceguera para los colores (daltonismo). Pensó que probablemente el humor vítreo de sus ojos (el fluido que llena el globo ocular detrás del cristalino) estaba teñido de azul, a diferencia de la falta de color encontrada en los ojos normales. Propuso que después de su muerte, sus ojos fueran diseccionados y se determinara el color del humor vítreo. Su deseo fue satisfecho; el día después de su muerte en julio de 1844, Joseph Ransome diseccionó sus ojos y encontró que el humor vítreo era absolutamente incoloro. Ransome, como muchos científicos, se mostró reticente a tirar las muestras. Colocó los ojos de Dalton en un recipiente con conservante (Fig. 1), donde permanecieron durante un siglo y medio.

A mediados de la década de 1990, biólogos moleculares en Inglaterra tomaron pequeñas muestras de las retinas de Dalton y extrajeron su DNA. Usando las secuencias génicas conocidas de las opsinas de los receptores rojo y verde, amplificaron las secuencias pertinentes (usando técnicas descritas en el capítulo



FIGURA 1: Ojos de Dalton. [Fuente: Professor J.D. Mollon, Department of Experimental Psychology, Cambridge University.]

9) y determinaron que Dalton tenía el gen de la opsina para el fotopigmento rojo pero carecía del gen de la opsina para el fotopigmento verde. Dalton era un dicromático verde⁻. De este modo, ciento cincuenta años después de su muerte, concluyó finalmente el experimento que comenzó Dalton con una hipótesis sobre la causa de su ceguera para los colores.

ción de variaciones ha proporcionado a los organismos modernos la capacidad de respuesta a una amplia gama de estímulos (Tabla 12-6). De los aproximadamente 20.000 genes del genoma humano, unos 1.000 codifican GPCR, incluidos centenares para estímulos olfativos y muchos receptores huérfanos de los que no se conocen aún sus ligandos naturales.

Todos los sistemas de transducción de señal bien estudiados que actúan a través de proteínas G heterotriméricas comparten algunas características comunes que reflejan su relación evolutiva **(Fig. 12-16)**. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana, un dominio (generalmente el bucle entre las hélices 6 y 7) que interacciona con una proteína G, y un dominio citoplasmático en el extremo carboxilo-terminal que experimenta la fosforilación reversible de varios residuos Ser o Thr. El sitio de unión del ligando (o, en el caso de los receptores de la luz, el receptor luminoso) está sepultado en lo profundo de la membrana y contiene residuos de varios segmentos transmembrana. La unión del ligando (o de la luz) induce un cambio de conformación en el receptor, exponiendo un dominio que puede interaccionar con una proteína G. Las proteínas G heterotriméricas activan o inhiben los enzimas efectores (adenilil ciclasa, PDE, o PLC), que cambian la concentración de un segundo mensajero (cAMP, cGMP, IP_3 o Ca^{2+}). En los sistemas de detección de hormonas, el resultado final es una proteína quinasa activada que regula algunos procesos celulares gracias a la fosforilación de una proteína básica en este proceso. En las neuronas sensoriales, el resultado es un cambio en el potencial de membrana y la consiguiente señal eléctrica que pasa de una neurona a otra en la ruta que conecta las células sensoriales con el cerebro.

Todos estos sistemas se autoinactivan. El GTP unido se convierte en GDP por la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G, a menudo aumentada por proteínas que activan la GTPasa (GAP) o proteínas RGS (*r*egulators of *G*-protein *s*ignaling; reguladores de la señal de proteínas G véase la Fig. 12-5 y el Recuadro 12-1, Fig. 4). En algunos casos, los enzimas efectores que son las dianas de la modulación por proteínas G también sirven como GAP. El mecanismo de desensibilización en el que se fosforila la región carboxilo-terminal seguida de la unión de arrestina es frecuente y podría ser, incluso, universal.

Cada uno de los 1.000 GPCR de vertebrados se expresa selectivamente, en ciertas líneas celulares o

TABLA 12-6 Algunas señales que actúan a través de GPCR

Aminas
Acetilcolina (muscarínico)
Dopamina
Adrenalina
Histamina
Serotonina

Péptidos
Angiotensina
Bombesina
Bradiquinina
Quimioquina
Colecistoquinina (CCK)
Endotelina
Hormona liberadora de la gonadotropina
Interleucina-8
Melanocortina
Neuropéptido Y
Neurotensina
Opioides
Orexina
Somatostatina
Tachiquinina
Hormona liberadora de tirotropina
Urotensina II

Hormonas proteicas
Hormona estimuladora del folículo
Gonadotropina
Lutropina-hormona coriogonadotrópica
Tirotropina

Prostanoides
Prostaciclina
Prostaglandina
Tromboxano

Otros
Cannabinoides
Lisoesfingolípidos
Melatonina
Estímulos olfativos
Rodopsina

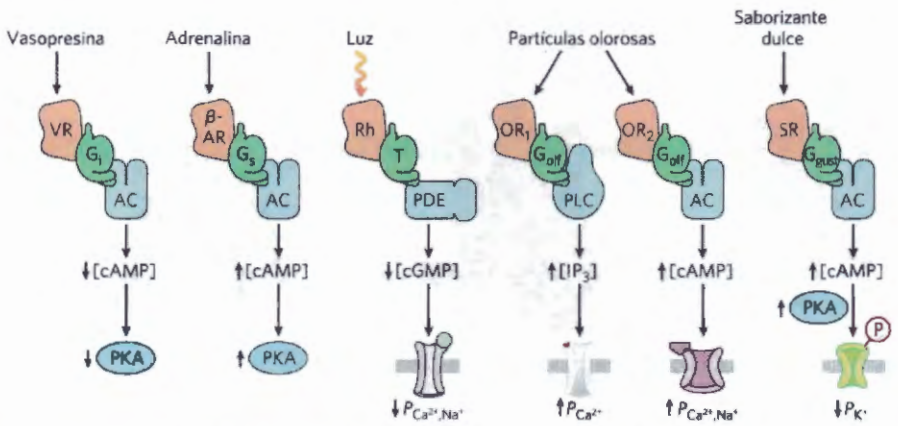


FIGURA 12-16 Características comunes de los sistemas de señalización que detectan hormonas, luz, olores y gustos. Los GPCR proporcionan especificidad de señal y su interacción con proteínas G produce la amplificación de la señal. Las proteínas G heterotriméricas activan enzimas efectores: la adenilil ciclasa (AC), la fosfolipasa C (PLC), y fosfodiesterasas (PDE) que degradan cAMP o cGMP. Los cambios en las concentraciones de los segundos mensajeros (cAMP, cGMP) provocan alteraciones en las actividades enzimáticas por fosforilación o alteraciones en la permeabilidad (*P*) a Ca^{2+}, Na^+ y K^+ de las superficies de la membrana. La despolarización o hiperpolarización resultante de la célula sensorial (la señal) se pasa a través de neuronas de enlace a los centros sensoriales del cerebro. En los casos mejor estudiados, la desensibilización incluye la fosforilación del receptor y la unión de una proteína (arrestina) que interrumpe las interacciones receptor-proteína G. (La vía de detección de la partícula olorosa mediante producción de IP3 e incremento de la [Ca^{2+}], mencionada en el texto, no se muestra aquí.) VR representa el receptor de la vasopresina; β-AR es el receptor β-adrenérgico; Rh, rodopsina; OR receptor olfativo; SR, receptor de gusto dulce.

bajo ciertas condiciones. En conjunto, permiten que las células y los tejidos respondan a un amplia gama de estímulos, entre los que se cuentan varias aminas de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, eicosanoides y otros lípidos, así como también la luz y otros compuestos detectados por el olfato y el gusto. La determinación de varias estructuras de GPCR mediante cristalografía **(Fig. 12-17)**, incluyendo el receptor β-adrenérgico y el receptor de histamina, ha estimulado un gran interés tanto en los mecanismos de transducción como en las posibilidades de alterar la actividad de los receptores mediante fármacos. Esos dos receptores son las dianas dc una variedad de medicamentos de amplio uso como beta-bloqueantes y antihistamínicos, respetivamente. Las similitudes estructurales entre GPCR van más allá del patrón común de las siete hélices transmembrana; como muestra la Figura 12-17, la estructuras de cinco GPCR diferentes son prácticamente superponibles. Queda claro que alguna característica de esta estructura tridimensional hace que sea efectiva como transductora de muchas y muy distintas señales.

RESUMEN 12.3 GPCR en la visión, el olfato y el gusto

- La vista, el olfato y el gusto en vertebrados emplea GPCR, que actúan a través de proteínas G heterotriméricas que cambian el V_m de las neuronas sensoriales.
- En los bastones y conos de la retina, la luz activa la rodopsina, que activa la proteína G transducina. La subunidad α liberada de la transducina activa una cGMP fosfodiesterasa, que disminuye la [cGMP] y cierra así los canales iónicos dependientes de cGMP de los segmentos externos de las neuronas. La hiperpolarización resultante en los bastones y conos transmite la señal a la siguiente neurona de la ruta y, finalmente, al cerebro.
- En las neuronas olfativas, los estímulos olfativos, que actúan a través de GPCR y proteínas G, desencadenan un incremento de la [cAMP] (por activación de la adenilil ciclasa) o un aumento en la [Ca^{2+}] (por activación de la PLC). Estos segundos mensajeros actúan sobre los canales iónicos y así sobre V_m.
- Las neuronas gustativas tienen GPCR que responden a los saborizantes alterando la [cAMP] que, a su vez, modifica el V_m mediante canales iónicos regulados.

Existe un alto grado de conservación de las proteínas de señalización y de los mecanismos de transducción a través de los sistemas de señalización y a través de las especies.

12.4 Receptores tirosina quinasas

Los **receptores tirosina quinasas (RTK)**, una familia de receptores de la membrana plasmática con actividad proteína quinasa intrínseca, transducen señales extracelulares mediante un mecanismo fundamentalmente diferente al de los GPCR. Los RTK tienen un dominio de unión a ligando en la cara extracelular de la membrana plasmática y un sitio activo enzimático en el lado citoplasmático, con los dos dominios conectados por un único segmento transmembrana. El dominio citoplasmático es una proteína quinasa que fosforila residuos Tyr (una Tyr quinasa) de proteínas diana específicas. Los receptores de insulina y del factor de crecimiento epidérmico son prototipos de las aproximadamente 60 RTK en humanos.

La estimulación del receptor de insulina inicia una cascada de reacciones de fosforilación de proteínas

La insulina regula tanto enzimas metabólicos como la expresión génica. La insulina no penetra en las células pero inicia una señal que discurre por un camino ramificado desde el receptor de la membrana plasmática a enzimas sensibles a la insulina en el citosol y al núcleo, donde estimula la transcripción de genes específicos. La proteína del receptor de insulina activo (INSR) consiste

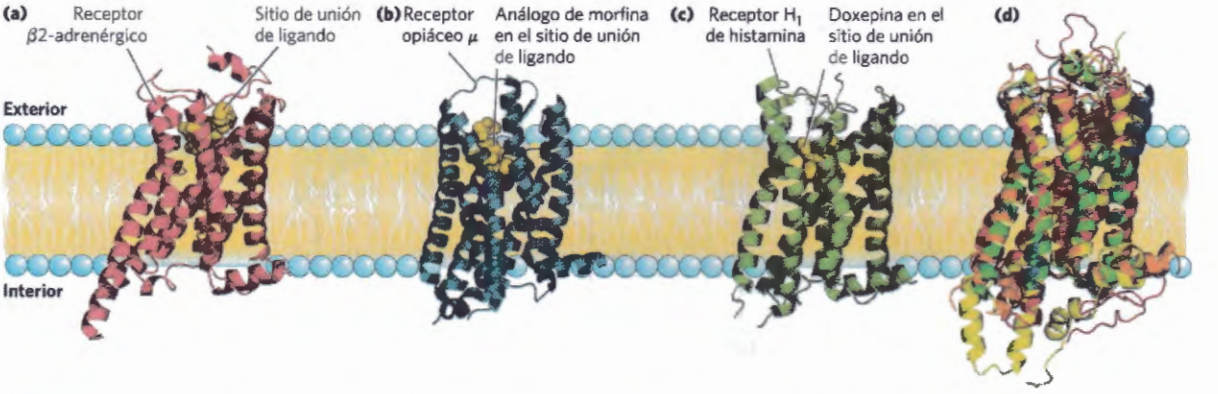


FIGURA 12-17 El receptor β-adrenérgico y otros GPCR. **(a)** El receptor b_2-adrenérgico con su agonista adrenalina, mostrado en amarillo, en el lugar de unión de ligandos. **(b)** El receptor opiáceo μ, diana de la morfina y de la codeína, con un análogo de la morfina en el sitio de unión de ligando. **(c)** El receptor H1 de histamina con el fármaco doxepina unido. **(d)** Cinco estructuras de GPCR superimpuestas que muestran la notable conservación de la estructura. Se muestran el receptor de adenosina A2A humano (naranja); el receptor b_1-adrenérgico de pavo (azul); el receptor b_2-adrenérgico humano (verde), la rodopsina de calamar (amarillo); y la rodopsina bovina (rojo). [Fuentes: (a) PDB ID 3SN6, S.G.F. Rasmussen et al., *Nature* 477:549, 2011. (b) PDB ID 4DKL, A. Manglik et al., *Nature* 485:321, 2012. (c) PDB ID 3RZE, T. Shimamura et al., *Nature* 475:65, 2011. (d) Receptor humano de adenosina A2A: PDB ID 3EML, V.P. Jaakoila et al., *Science* 322:1211, 2008; receptor b_1-adrenérgico de pavo: PDB ID 2VT4, A. Warne et al., *Nature* 454:486, 2008; receptor b_2-adrenérgico humano: PDB ID 2RH1, V. Cherezov et al., *Science* 318:1258, 2007; rodopsina de calamar: PDB ID 2Z73, M. Murakami y T. Kouyama, *Nature* 453:363, 2008; rodopsina bovina: PDB ID 1U19, T. Okada et al., *J. Mol. Biol.* 342:571, 2004.]

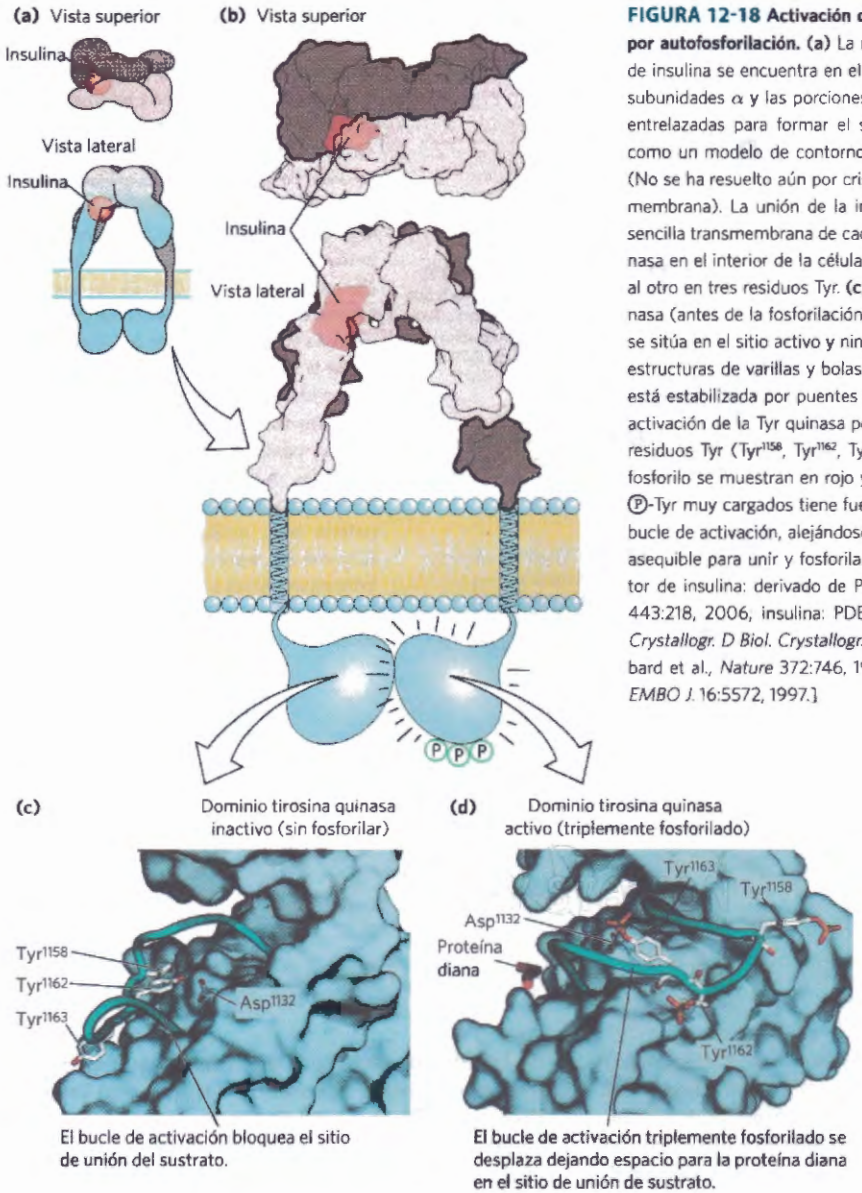


FIGURA 12-18 Activación de la Tyr quinasa del receptor de insulina por autofosforilación. **(a)** La región de unión de la insulina del receptor de insulina se encuentra en el exterior de la célula y comprende **(b)** dos subunidades α y las porciones extracelulares de las dos subunidades β, entrelazadas para formar el sitio de unión de la insulina (se muestra como un modelo de contorno de superficie de la estructura cristalina). (No se ha resuelto aún por cristalografía la estructura del dominio transmembrana). La unión de la insulina se comunica a través de la hélice sencilla transmembrana de cada subunidad β a los dos dominios Tyr quinasa en el interior de la célula activándolos para que se fosforilen el uno al otro en tres residuos Tyr. **(c)** En la forma inactiva del dominio Tyr quinasa (antes de la fosforilación de las Tyr), el bucle de activación (verde) se sitúa en el sitio activo y ninguno de los residuos Tyr críticos (blanco y estructuras de varillas y bolas rojas) está fosforilado. Esta conformación está estabilizada por puentes de hidrógeno entre Tyr^{1162} y Asp^{1132}. **(d)** La activación de la Tyr quinasa permite que cada subunidad β fosforile tres residuos Tyr (Tyr^{1158}, Tyr^{1162}, Tyr^{1163}) de la otra subunidad β. (Los grupos fosforilo se muestran en rojo y naranja. La introducción de tres residuos Ⓟ-Tyr muy cargados tiene fuerza un cambio de 30 Å en la posición del bucle de activación, alejándose del sitio de unión de sustrato, que queda asequible para unir y fosforilar una proteína diana. [Fuentes: (b) Receptor de insulina: derivado de PDB ID 2DTG, N.M. McKern et al., *Nature* 443:218, 2006, insulina: PDB ID 2CEU, J.L. Whittingham et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62:505, 2006. (c) PDB ID 1IRK, S.R. Hubbard et al., *Nature* 372:746, 1994. (d) PDB ID 1IR3, S.R. Hubbard et al., *EMBO J.* 16:5572, 1997.]

en dos subunidades α idénticas que sobresalen de la cara externa de la membrana plasmática y dos subunidades β transmembrana con su extremo carboxilo sobresaliendo dentro del citosol (un dímero de monómeros $\alpha\beta$) **(Fig. 12-18)**. Las subunidades α contienen el dominio de unión a insulina, y los dominios intracelulares de las subunidades β contienen la actividad proteína quinasa que transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al grupo hidroxilo de residuos Tyr en proteínas diana específicas. La señalización a través de INSR empieza cuando la unión de una molécula de insulina entre las dos subunidades del dímero activa la actividad Tyr quinasa y cada subunidad β fosforila tres residuos Tyr críticos cerca del extremo carboxilo de la otra subunidad β. Esta **autofosforilación** abre el sitio activo, permitiendo que el enzima fosforile residuos Tyr de otras proteínas diana. El mecanismo de activación de la proteína quinasa del INSR es similar al descrito para la PKA y la PKC: una región del dominio citoplasmático (una secuencia autoinhibidora) que tapa normalmente el sitio activo se desplaza, después de ser fosforilada, fuera del sitio activo, abriendo el sitio para la unión de proteínas diana (Fig. 12-18).

Cuando INSR se autofosforila **(Fig. 12-19**, paso ❶) y se convierte en una Tyr quinasa activa, una de sus proteínas diana es el sustrato-1del receptor de insulina (IRS-1 paso ❷). Una vez fosforilado en varios de sus residuos Tyr, IRS-1 pasa a ser el punto de nucleación de un complejo de proteínas (paso ❸) que transportan el mensaje desde el receptor de insulina a dianas finales en el citosol y el núcleo, a través de una larga serie de proteínas intermediarias. Primero, un residuo Ⓟ-Tyr de IRS-1 se une al **dominio SH2** de la proteína Grb2. (SH2 es una abreviación de *Src homology 2*, así llamado porque la secuencia de un dominio SH2 es similar a un dominio de otra proteína Tyr quinasa llamada Src). Muchas proteínas de señalización contienen dominios SH2, todos los cuales unen residuos Ⓟ-Tyr de otra proteína. Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*,

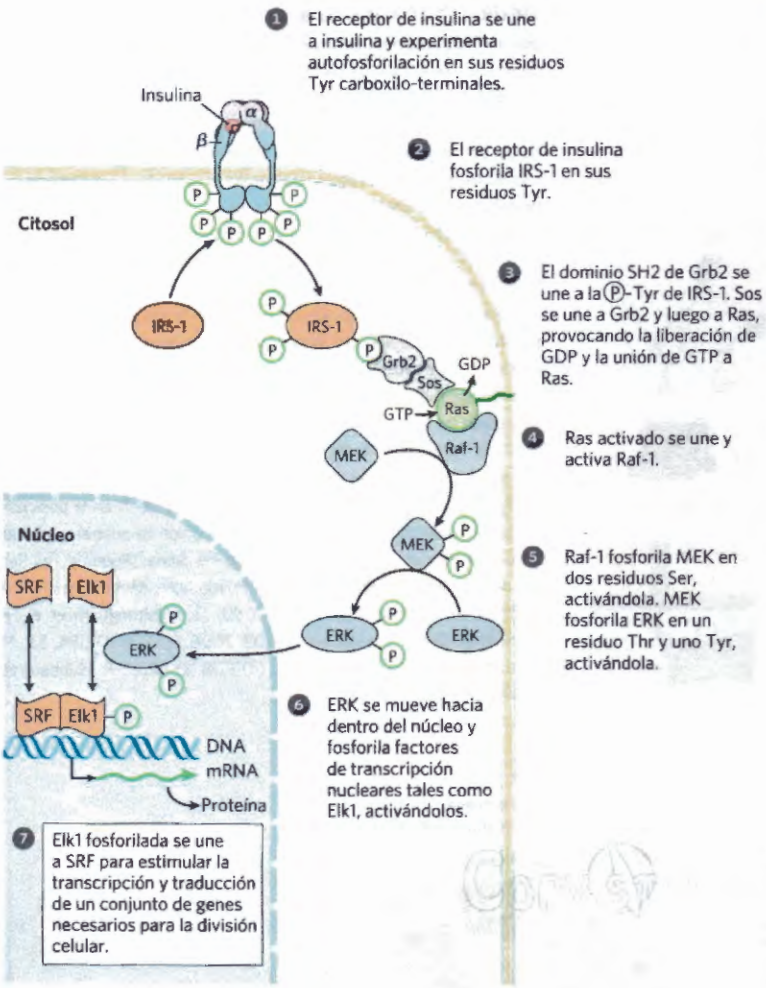


FIGURA 12-19 Regulación de la expresión génica por insulina a través de una cascada MAP quinasa. El receptor de insulina (INSR) consiste en dos subunidades α en la cara externa de la membrana plasmática y dos subunidades β que atraviesan la membrana y sobresalen de la cara citosólica. La unión de insulina a las subunidades α provoca un cambio de conformación que permite la autofosforilación de residuos Tyr en el dominio carboxilo-terminal de las subunidades β. La autofosforilación activa además el dominio Tyr quinasa, que cataliza entonces la fosforilación de otras proteínas diana. La vía de señalización por la que la insulina regula la expresión de genes específicos consiste en una cascada de proteína quinasas, cada una de las cuales activa la siguiente. El INSR es una Tyr quinasa específica; las otras quinasas (todas ellas mostradas en azul) fosforilan residuos Ser o Thr. MEK es una quinasa de especificidad doble, que fosforila tanto residuos Thr como Tyr en ERK (*extracellular regulated kinase*: quinasa regulada extracelularmente); MEK es quinasa activadora de ERK activada por mitógeno; SRF es el factor de respuesta sérico.

proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento) es una proteína adaptadora sin actividad enzimática intrínseca. Su función es poner en contacto dos proteínas (en este caso IRS-1 y la proteína Sos) que han de interaccionar para permitir la transducción de señal. Además de su dominio SH2 (de unión a Ⓟ-Tyr) Grb2 también contiene un segundo dominio de unión de proteína, SH3, que se une a una región rica en prolinas de Sos y recluta Sos al complejo proteico en formación. Cuando se une a Grb2, Sos actúa como factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF) catalizando la sustitución del GDP unido por GTP en Ras, una proteína G.

Ras es el prototipo de una familia de **pequeñas proteínas G** que intervienen en una amplia variedad de transducciones de señal (véase el Recuadro 12-1). Al igual que la proteína G trimérica que funciona con el sistema β-adrenérgico (Fig. 12-5), Ras puede existir en la conformación con GTP unido (activa) o GDP unido (inactiva), pero Ras (~20 kDa) actúa en forma monomérica. Cuando se une GTP, Ras puede activar una proteína quinasa, Raf-1 (Fig. 12-19, paso ❹), la primera de tres proteína quinasas (Raf-1, MEK, y ERK) que forman una cascada en la que cada quinasa activa la siguiente por fosforilación (paso ❺). Las proteína quinasas MEK y ERK se activan por fosforilación de un residuo Thr y otro Tyr. Cuando se activa, ERK interviene en algunos de los efectos biológicos de la insulina al entrar en el núcleo y fosforilar factores de transcripción tales como Elk1 (paso ❻), que modula la transcripción de unos 100 genes regulados por insulina (paso ❼), algunos de los cuales codifican proteínas esenciales para la división celular. De este modo la insulina actúa como factor de crecimiento.

Las proteínas Raf-1, MEK y ERK son miembros de tres grandes familias, para las que se utilizan varias nomenclaturas. ERK es un miembro de la familia **MAPK** (proteínas quinasa activadas por mitógeno; los mitógenos son señales extracelulares que inducen la mitosis y la división celular). Poco después del descubrimiento del primer enzima MAPK, se encontró que este enzima era activado por otra proteína quinasa, a la que se denominó MAP quinasa quinasa (MEK pertenece a esta familia); cuando se descubrió una tercera quinasa que activaba la MAP quinasa quinasa se le dio el nombre más bien ridículo de MAP quinasa quinasa quinasa (Raf-1 es un miembro de esta familia). Ligeramente menos incómodos son los acrónimos de estas tres familias, MAPK, MAPKK, MAPKKK. Las quinasas de las familias MAPK y MAPKKK son específicas para residuos Ser o Thr, mientras que las MAPKK (aquí, MEK) fosforilan un residuo Ser y otro Tyr de su sustrato, una MAPK (aquí, ERK).

Los bioquímicos reconocen ahora esta vía de la insulina sólo como un ejemplo de un esquema más

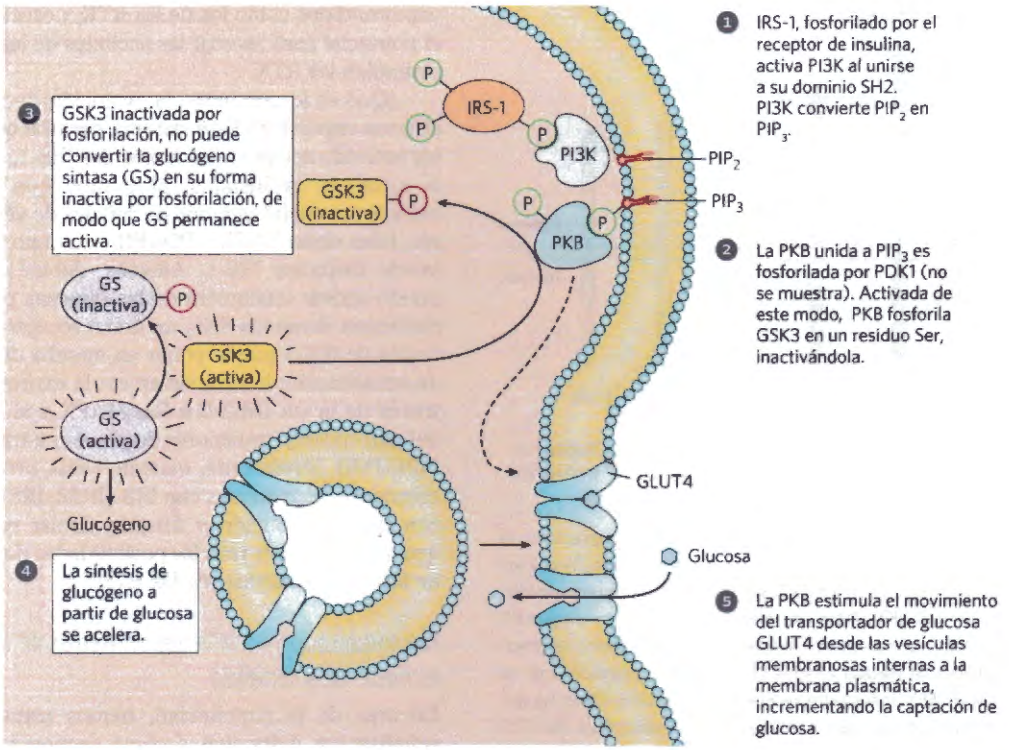


FIGURA 12-20 Acción de la insulina sobre la síntesis de glucógeno y el desplazamiento de GLUT4 a la membrana plasmática. La activación de la PI3 quinasa (PI3K) por IRS-1 fosforilado (a través de la proteína quinasa B (PKB), desplazamiento del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática y activación de la glucógeno sintasa.

general en el que las señales hormonales, a través de vías similares a la que se muestra en la Figura 12-19, provocan un cambio en la fosforilación de enzimas diana por proteína quinasas o por fosfoproteína fosfatasas. La diana de fosforilación es, a menudo, otra proteína quinasa, que fosforila entonces una tercera proteína quinasa y así sucesivamente. El resultado es una cascada de reacciones que amplifica la señal inicial en muchos órdenes de magnitud (véase la Fig. 12-1b). Las **cascadas MAPK** (Figura 12-19) intervienen en la señalización iniciada por diversos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Otro esquema general, representado por la ruta del receptor de insulina, es la utilización de proteínas adaptadoras no enzimáticas para poner en contacto los componentes de una ruta de señalización ramificada, que ahora comentaremos.

El fosfolípido de membrana PIP_3 actúa en una rama de la señalización de la insulina

La ruta de señalización de la insulina se ramifica en IRS-1 (Fig. 12-19, paso ❷). Grb2 no es la única proteína que se asocia con IRS-1 fosforilado. El enzima fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) se une a IRS-1 a través del dominio SH2 de PI3K **(Fig. 12-20)**. Activada de esta manera, PI3K convierte el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3) mediante la transferencia de un grupo fosforilo del ATP. El grupo de cabeza con múltiples cargas (negativas) del PIP_3, que sobresale en el lado citoplasmático de la membrana plasmática, es el punto de inicio de una segunda rama de señalización en la que interviene otra cascada de proteína quinasas. Cuando está unida a PIP_3, la proteína quinasa B (PKB; también llamada Akt) es fosforilada y activada todavía por aun otra proteína quinasa, PDK1. La PKB activada fosforila entonces residuos Ser o Thr de sus proteínas diana, una de las cuales es la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). En su forma activa no fosforilada, GSK3 fosforila la glucógeno sintasa, inactivándola y, de este modo, contribuyendo así a la disminución de la síntesis de glucógeno. (Este mecanismo es sólo una parte de la explicación de los efectos de la insulina sobre el metabolismo del glucógeno; véase la Fig. 15-42). Cuando es fosforilada por PKB, la GSK3 se inactiva. Al impedir de esta manera la inactivación de la glucógeno sintasa en hígado y músculo, la cascada de fosforilaciones de proteínas iniciada por la insulina estimula la síntesis de glucógeno (Fig. 12-20). En una tercera vía de señalización en el músculo y en el tejido adiposo, la PKB provoca, con participación de la clatrina, el movimiento de los transportadores de glucosa (GLUT4) desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática, estimulando la captación de glucosa desde la sangre (Fig. 12-20 paso ❺; véase también el Recuadro 11-1).

Al igual que en todas las vías de señalización, existe un mecanismo para terminar la actividad de la ruta PI3K-PKB. Una fosfatasa específica de PIP_3 (PTEN en humanos) elimina el grupo fosforilo en la posición 3 de PIP_3 dando PIP_2, el cual ya no sirve como sitio de unión de PKB con lo que se trunca la ruta de señalización. En diversos tipos de cáncer a menudo se

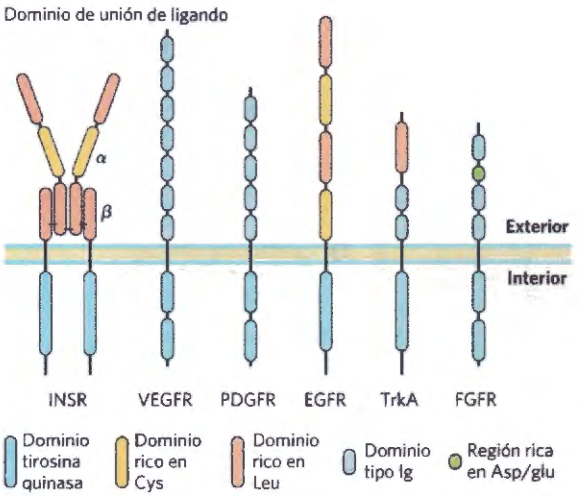


FIGURA 12-21 Tirosina quinasas de receptor. Entre los receptores de factores de crecimiento que señalizan a través de actividad Tyr quinasa se encuentran los de la insulina (INSR), factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGFR), factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGFR); factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento nervioso de elevada afinidad (TrkA) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Todos estos receptores tienen un dominio Tyr quinasa en el lado citoplasmático de la membrana plasmática (azul). El dominio extracelular es diferente para cada tipo de receptor lo que refleja las diferentes especificidades de los factores de crecimiento. Estos dominios extracelulares son, típicamente, combinaciones de motivos estructurales tales como segmentos ricos en cisteína o leucina y segmentos que contienen uno de entre los diversos motivos comunes de las inmunoglobulinas (Ig). En el genoma humano están codificados muchos otros receptores de este tipo, cada uno de ellos con un dominio extracelular y especificidad de ligando diferente.

encuentra que el gen PTEN ha experimentado mutación lo que da lugar a un circuito de regulación defectuoso y a concentraciones anormalmente elevadas de PIP_3 y de actividad PKB. El resultado parece ser una señal continua para la división celular y, en consecuencia, el crecimiento tumoral. ■

El receptor de insulina es el prototipo de una serie de enzimas receptores que tienen una estructura similar y actividad RTK **(Fig. 12-21)**. Los receptores del EGF y del PDGF, por ejemplo, presentan similitud estructural y de secuencia con el INSR, y ambos tienen una actividad proteína Tyr quinasa que fosforila IRS-1. Muchos de estos receptores dimerizan a continuación de la unión de ligando; INSR es la excepción, pues ya es un dímero $(\alpha\beta)_2$ antes de que se una la insulina. (El protómero del receptor de insulina es una unidad $\alpha\beta$). La unión de proteínas adaptadoras tales como Grb2 a residuos Ⓟ-Tyr es un mecanismo común para promover interacciones proteína-proteína iniciadas por las RTK, tema al que volveremos en la Sección 12.6.

Además de los muchos receptores que actúan como proteína Tyr quinasas (las RTK), varias proteínas de membrana plasmática semejantes a receptores tienen actividad proteína Tyr fosfatasa. Basándonos en la estructura de estas proteínas, podemos suponer que sus ligandos son componentes de la matriz extracelular o de las moléculas de la superficie de otras células. Aunque sus papeles en la señalización no están todavía tan bien comprendidos como los de las RTK, poseen claramente el potencial para invertir las acciones de las señales que estimulan las RTK.

¿Qué es lo que incitó la evolución de tan complejo sistema regulador? Este sistema permite que un receptor activado active varias moléculas IRS-1, amplificando la señal de la insulina, al tiempo que proporciona medios para la integración de señales de varios receptores, tales como EGFR y PDGFR, cada uno de los cuales puede fosforilar IRS-1. Además, debido a que IRS-1 puede activar cualquiera de las diversas proteínas que contienen dominios SH2, un único receptor actuando a través de IRS-1 puede poner en marcha dos o más vías de señalización; la insulina afecta la expresión génica a través de la vía Grb2-Sos-Ras-MAPK y al metabolismo del glucógeno y transporte de glucosa a través de la vía PI3K-PKB. Finalmente, existen varias proteínas estrechamente relacionadas con IRS (IRS2, IRS-3), cada una con una distribución y función tisular característica, que aún enriquece más las posibilidades de señalización de las rutas iniciadas por las RTK.

La comunicación cruzada entre sistemas de señalización es frecuente y compleja

En aras de la simplicidad, hemos tratado rutas de señalización individuales como secuencias separadas de acontecimientos que conducen a consecuencias metabólicas diferentes, aunque de hecho hay una extensa comunicación cruzada entre los sistemas de señalización. Los circuitos reguladores que gobiernan el metabolismo están ricamente entretejidos en múltiples niveles. Hemos analizado las rutas de señalización de la insulina y de la adrenalina separadamente, pero no operan de forma independiente. La insulina se opone a los efectos metabólicos de la adrenalina en la mayoría de tejidos por lo que la activación de la vía de señalización de la insulina atenúa directamente la señalización a través del sistema de señalización β-adrenérgico. Por ejemplo, la INSR quinasa fosforila directamente dos residuos Tyr en la cola citoplasmática de un receptor β_2-adrenérgico, y la PKB, activada por la insulina **(Fig. 12-22)**, fosforila dos residuos Ser en la misma región. La fosforilación de estos cuatro residuos provoca la internalización, ayudada por la clatrina, del receptor β_2-adrenérgico, dejándolo inactivo y disminuyendo la sensibilidad de la célula a la adrenalina. Un segundo tipo de comunicación cruzada que se da entre estos receptores es la que tiene lugar cuando residuos Ⓟ-Tyr en el receptor b_2-adrenérgico, fosforilado por INSR actúan como puntos de nucleación para las proteínas que contienen el dominio SH2 tales como Grb2 (Fig. 12-22, lado izquierdo). La activación de la MAPK ERK por la insulina (véase la Fig. 12-19) es de 5 a 10 veces superior en presencia del receptor b_2-adrenérgico, probablemente a causa de esta comunicación cruzada. Los sistemas de señalización que utilizan cAMP y Ca^{2+} también muestran una interacción importante; cada segundo mensajero afecta a la generación y concentración del otro. Uno de los retos principales de la biología de sistemas es discernir los efectos de tales interacciones sobre los patrones metabólicos generales de cada tejido: ¡una tarea para valientes!

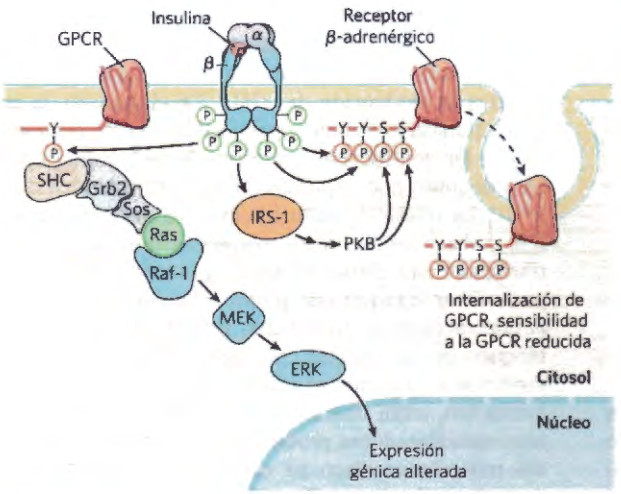


FIGURA 12-22 Intercomunicación entre el receptor de insulina y el receptor β-adrenérgico (u otro GPCR). Cuando la insulina unida activa INSR, su Tyr quinasa fosforila directamente el receptor b_2-adrenérgico (lado derecho) en dos residuos Tyr (Tyr^{350} y Tyr^{364}) cerca de su carboxilo terminal e, indirectamente (mediante la activación de la proteína quinasa B (PKB); véase la Fig. 12-20) produce la fosforilación de dos residuos Ser en la misma región. El efecto de estas fosforilaciones es la internalización del receptor adrenérgico, reduciendo la respuesta al estímulo adrenérgico. Alternativamente (lado izquierdo) la fosforilación catalizada por INSR de un GPCR (un receptor adrenérgico o de otro tipo) en una Tyr del carboxilo terminal crea el punto de nucleación para activar la cascada MAPK (véase la Fig. 12-19) en la que Grb2 sirve de proteína adaptadora. En este caso, INSR ha utilizado el GPCR para aumentar su propia señal.

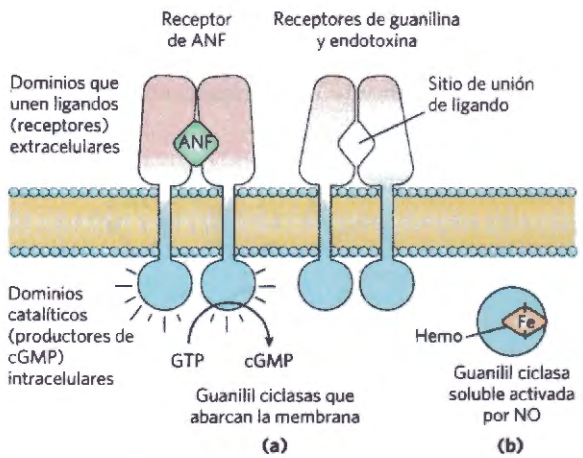


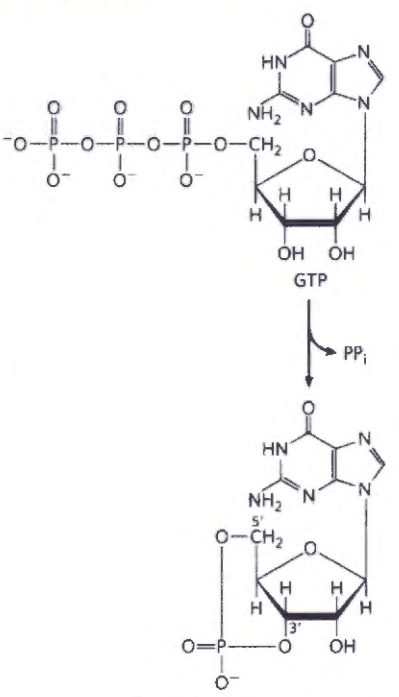
FIGURA 12-23 Dos tipos de guanilil ciclasa que participan en la transducción de señales. (a) Un tipo es un homodímero con un único segmento que abarca la membrana en cada monómero y que conecta el dominio de unión de ligando extracelular con el dominio guanilil ciclasa intracelular. Receptores de este tipo se utilizan para detectar dos ligandos extracelulares: factor natriurético auricular (ANF: receptores en células de los conductos renales colectores y del músculo liso de los vasos sanguíneos) y guanilina (hormona peptídica producida en el intestino, con receptores en las células del epitelio intestinal). El receptor de guanilina es también la diana de una endotoxina bacteriana que produce diarrea severa. **(b)** El otro tipo es un enzima soluble que contiene hemo y que se activa por óxido nítrico r (NO) intracelular; esta forma se encuentra en muchos tejidos, entre ellos el músculo liso del corazón y de los vasos sanguíneos

RESUMEN 12.4 Receptores tirosina quinasas

- El receptor de insulina, INSR, es el prototipo de enzimas receptores con actividad Tyr quinasa. Cuando se une la insulina, cada unidad αβ de INSR fosforila la subunidad β de su pareja, activando la actividad Tyr quinasa del receptor. La quinasa cataliza la fosforilación de residuos Tyr sobre otras proteínas tales como IRS-1.
- Los residuos fosfotirosina de IRS-1 actúan como sitios de unión para proteínas con dominios SH2. Algunas de estas proteínas, como Grb2, tienen dos o más dominios de unión de proteínas y pueden actuar como adaptadores que acercan las dos proteínas a posiciones muy próximas.
- Sos unida a Grb2 cataliza el intercambio GDP-GTP en Ras (una proteína G pequeña) que, a su vez, activa una cascada MAPK que finaliza con la fosforilación de proteínas diana en el citosol y en el núcleo. El resultado son cambios metabólicos específicos y alteración de la expresión génica.
- El enzima PI3K, activado por interacción con IRS-1, transforma el lípido de membrana PIP_2 en PIP_3, que se convierte en el punto de nucleación para proteínas en una segunda y tercera ramas de la señalización por insulina.
- Hay amplias interconexiones entre las rutas de señalización, que permiten la integración y la regulación fina de múltiples efectos hormonales.

12.5 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G

Las guanilil ciclasas **(Fig. 12-23)** son receptores enzimáticos que, cuando se activan, convierten el GTP en el segundo mensajero **guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico o cGMP)**:

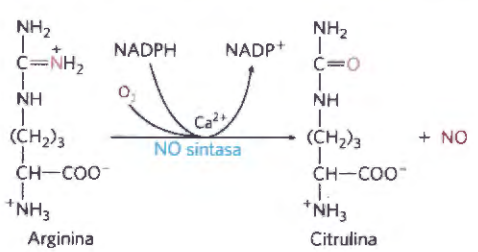


Muchas de las acciones del cGMP en animales se realizan mediante la **proteína quinasa dependiente de cGMP** también llamada **proteína quinasa G (PKG)**. Al activarse por acción del cGMP, la PKG fosforila residuos Ser y Thr en proteínas diana. Los dominios catalítico y regulador de este enzima se encuentran en un polipéptido sencillo (M_r ~80.000). Parte del dominio regulador encaja cómodamente en la hendidura de unión del sustrato. La unión de cGMP fuerza este pseudosustrato fuera del sitio de unión abriendo el sitio a proteínas diana que contienen la secuencia consenso para la PKG.

El GMP cíclico transporta mensajes diferentes en tejidos diferentes. En el riñón y en el intestino desencadena cambios en el transporte iónico y en la retención de agua; en el músculo cardíaco (un tipo de músculo liso) señala relajación; en el cerebro puede estar relacionado tanto con el desarrollo como con el funcionamiento del cerebro adulto. La guanilil ciclasa del riñón se activa por la hormona peptídica **factor natriurético auricular (ANF)**, liberada por las células de la aurícula del corazón cuando éste se ensancha por un incremento del volumen sanguíneo. Transportado por la sangre al riñón, el ANF activa la guanilil ciclasa de las células de los conductos colectores (Fig. 12-23a). El incremento resultante de la [cGMP] provoca un aumento de la excreción renal de Na^+ y, por consiguiente, de agua impulsado por el cambio de presión osmótica. La pérdida de agua reduce el volumen sanguíneo, contrarrestando el estímulo que inicialmente llevó a la secreción de ANF. El músculo liso vascular tiene también un receptor guanilil ciclasa de ANF; al unirse a este receptor, el ANF provoca la relajación (vasodilatación) de los vasos sanguíneos, que aumenta el flujo sanguíneo y, por tanto, reduce la presión sanguínea.

Un receptor guanilil ciclasa similar de la membrana plasmática de las células epiteliales que recubren el intestino se activa por el péptido **guanilina** (Fig. 12-23a), que regula la secreción de Cl^- en el intestino. Este receptor es también la diana de una endotoxina peptídica termoestable producida por *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas. El incremento en la [cGMP] provocado por la endotoxina incrementa la secreción de Cl^- y, en consecuencia, decrece la reabsorción de agua por el epitelio intestinal, produciendo diarrea.

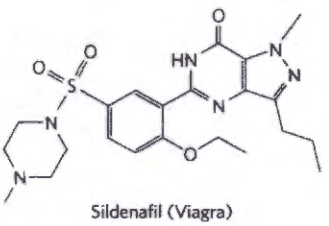
Un tipo totalmente diferente de guanilil ciclasa es una proteína citosólica con un grupo hemo unido fuertemente (Fig. 12-23b), un enzima se activa por óxido nítrico (NO). El óxido nítrico se produce a partir de arginina por una **NO sintasa** dependiente de Ca^{2+}, presente en muchos tejidos de mamíferos, y difunde desde su célula de origen hasta las células vecinas.

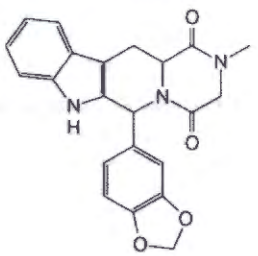


El NO es suficientemente apolar para cruzar las membranas plasmáticas sin un transportador. En la célula diana, se une al grupo hemo de la guanilil ciclasa y activa la producción de cGMP. En el corazón, la proteína quinasa dependiente de cGMP reduce la intensidad de las contracciones al estimular la bomba (o bombas) de iones que expulsan Ca^{2+} del citosol.

La relajación inducida por NO del músculo cardíaco es la misma respuesta que ocasionan la nitroglicerina y otros nitrovasodilatadores que se toman para aliviar la **angina de pecho**, el dolor provocado por la contracción de un corazón privado de O_2 debido al bloqueo de las arterias coronarias. El óxido nítrico es inestable y su acción es breve; segundos después de su formación, sufre una oxidación a nitrito o nitrato. Los nitrovasodilatadores producen una relajación duradera del músculo cardíaco ya que tardan varias horas en degradarse, produciendo una corriente continua de NO. El valor de la nitroglicerina como tratamiento para la angina de pecho se describió de manera inesperada en fábricas que producían nitroglicerina como explosivo en la década de 1860. Los trabajadores que tenían angina declararon que su situación mejoraba mucho durante la semana laboral pero que empeoraba los fines de semana. Los médicos que trataban a estos trabajadores oyeron esta historia tan a menudo que realizaron la conexión con lo que nació el medicamento.

Los efectos del incremento en la síntesis de cGMP disminuyen cuando cesa el estímulo, debido a que una fosfodiesterasa específica (cGMP PDE) convierte el cGMP en 5'-GMP inactivo. Los humanos poseen diversas isoformas de cGMP PDE con diferentes distribuciones tisulares. La isoforma de los vasos sanguíneos del pene es inhibida por el fármaco sildenafil (Viagra) y tadalafil (Cialis) que, por consiguiente, hacen que la [cGMP] permanezca elevada una vez ha aumentado por el estímulo adecuado, lo que explica la utilidad de este medicamento en el tratamiento de la disfunción eréctil.


Sildenafil (Viagra)


Tadalafil (Cialis)

El GMP cíclico tiene otro modo de acción en el ojo de los vertebrados: provoca la apertura de canales específicos de iones en los bastones y conos de la retina, como ya discutimos en la Sección 12.3.

RESUMEN 12.5 Receptores guanilil ciclasas, cGMP y proteína quinasa G

■ Varias señales, entre ellas el factor natriurético auricular y la guanilina, actúan a través de receptores enzimáticos con actividad guanilil ciclasa. El cGMP así producido es un segundo mensajero que activa la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG). Este enzima altera el metabolismo al fosforilar enzimas diana específicos.

■ El óxido nítrico es un mensajero de vida corta que estimula una guanilil ciclasa soluble, aumentando la [cGMP] y estimulando la PKG.

12.6 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana

De los estudios de los sistemas de señalización han emergido dos generalizaciones tales como las discutidas hasta el momento: En primer lugar, las proteína quinasas que fosforilan y las proteína fosfatasas que desfoforilan residuos de Tyr, Ser y Thr son cruciales en la señalización, afectando de manera *directa* las actividades de un gran número de sustratos proteicos por fosforilación/desfosforilación. En segundo lugar, las interacciones proteína-proteína producidas por la fosforilación reversible de residuos Tyr, Ser y Thr en las proteínas de señalización crean *sitios de anclaje* para otras proteínas que producen efectos *indirectos* sobre proteínas más adelante en la ruta de señalización. De hecho, muchas proteínas de señalización son *polivalentes* en el sentido de que pueden interaccionar con varias proteínas diferentes de manera simultánea para formar complejos de señalización multiproteicos. En esta sección se presentan unos cuantos ejemplos para ilustrar los principios generales de las interacciones proteicas dependientes de fosforilación en las vías de señalización.

Módulos proteicos unen residuos Tyr, Ser o Thr fosforilados de proteínas asociadas

La proteína Grb2 de la ruta de señalización de la insulina (Figs. 12-19 y 12-22) se une a través de su dominio SH2 a otras proteínas que contienen residuos Ⓟ-Tyr expuestos. El genoma humano codifica al menos 87 proteínas que contienen SH2, muchas de las cuales ya se sabe que participan en señalización. El residuo Ⓟ-Tyr está unido en un bolsillo profundo de un dominio SH2 y en el que todos los oxígenos del fosfato participan en interacciones por puente de hidrógeno o electrostáticas; en la fijación tienen un papel prominente las cargas positivas de dos residuos Arg. La especificidad de las interacciones entre diferentes proteínas con dominios SH2 con las diversas proteínas que contienen Ⓟ-Tyr se explican por diferencias sutiles en la estructura de sus dominios SH2. El dominio SH2 interacciona de manera típica con una Ⓟ-Tyr (a la que se le asigna la posición índice 0) y con los tres residuos siguientes hacia el extremo carboxilo (designados +1, +2, +3). Algunos dominios SH2 (Src, Fyn, Hck, Nck) prefieren residuos cargados negativamente en las posiciones +1 y +2; otros (PLCγ1, SHP2) tienen un surco hidrofóbico largo que se une a residuos alifáticos en las posiciones +1 a +5. Estas diferencias definen subclases de dominios SH2 que tienen diferentes especificidades de asociación.

Los dominios fijadores de fosfotirosina, o **dominios PTB** son otro tipo de dominios de unión a proteínas Ⓟ-Tyr **(Fig. 12-24)**, pero se distinguen de los dominios SH2 por sus secuencias y estructuras tridimensionales críticas. El genoma humano codifica 24 proteínas que contienen dominios PTB, incluida IRS-1, que ya hemos encontrado en su función como proteína adaptadora en la transducción de la señal de la insulina (Fig. 12-19). Los sitios de unión Ⓟ-Tyr para los dominios SH2 y PTB en proteínas asociadas son generados mediante Tyr quinasas y eliminados por fosfoproteína fosfatasas (PTP)

Como hemos visto, otras proteína quinasas de señalización, entre ellas PKA, PKC, PKG y miembros de la cascada MAPK, fosforilan residuos Ser o Thr en sus proteínas diana que, en algunos casos, adquieren la capacidad de interaccionar con proteínas asociadas a través del residuo fosforilado, poniendo en marcha un proceso secuencial. Se ha identificado toda una sopa de letras de dominios que unen residuos Ⓟ-Ser o Ⓟ-Thr, y a buen seguro que se identificarán aún más. Cada dominio favorece una cierta secuencia alrededor del residuo fosforilado por lo que las proteínas con este dominio se unen e interaccionan con un subconjunto específico de proteínas fosforiladas.

En algunos casos la región de una proteína que une Ⓟ-Tyr de una proteína sustrato está enmascarada por su interacción con una Ⓟ-Tyr en la misma proteína. Por ejemplo, la proteína Tyr quinasa soluble Src, cuando está fosforilada en un residuo Tyr crítico se vuelve inactiva porque un dominio SH2 necesario para fijarse a la proteína sustrato se une a una Ⓟ-Tyr interna. Cuando se hidroliza este residuo Ⓟ-Tyr por una fosfoproteína fosfatasa, se activa la actividad Tyr quinasa de Src **(Fig. 12-25a)**. De modo parecido la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es inactiva cuando está fosforilada en

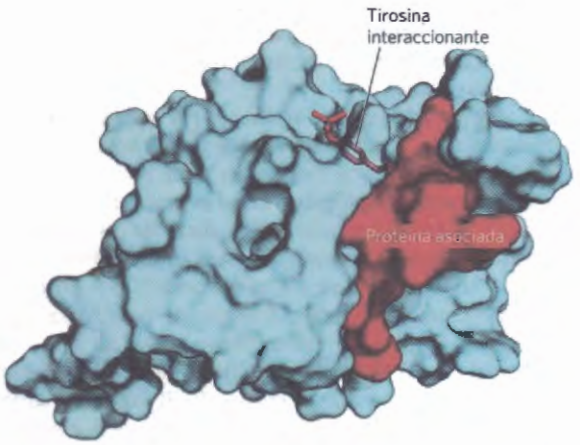


FIGURA 12-24 Interacción de un dominio PTB con un residuo Ⓟ-Tyr en una proteína asociada. El dominio PTB se muestra en azul en una representación de contorno de superficie. La proteína asociada se mantiene unida a la quinasa mediante múltiples interacciones no covalentes, que confieren especificidad a la interacción y colocan el residuo de Ⓟ-Tyr en un bolsillo de fijación en el centro activo del enzima. [Fuente: PDB ID 1SHC, M.M. Zhou et al., *Nature* 378:584, 1995.]

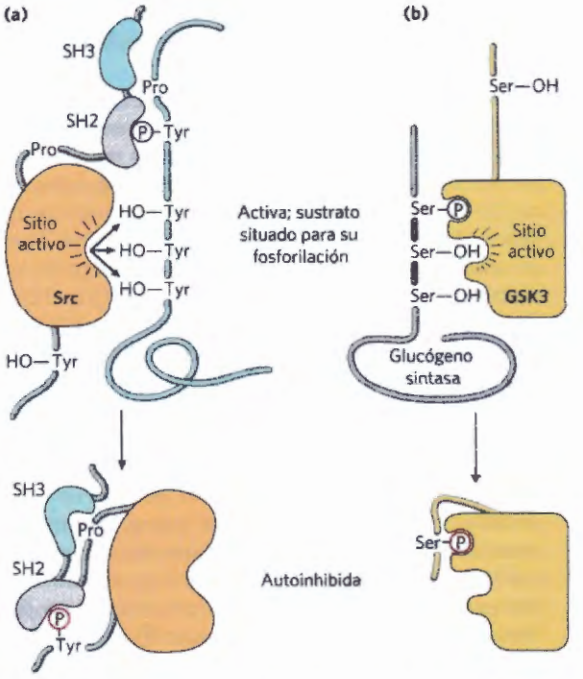


FIGURA 12-25 Mecanismo de autoinhibición de Src y GSK3. **(a)** En la forma activa de la Tyr quinasa Src, un dominio SH2 une una Ⓟ-Tyr de la proteína sustrato y un dominio SH3 une una región rica en prolina del sustrato, recubriendo el sitio activo de la quinasa con varios residuos Tyr diana del sustrato (parte superior). Cuando se fosforila Src en un residuo Tyr específico (parte inferior), el dominio SH2 se une a la Ⓟ-Tyr interna en lugar de la Ⓟ-Tyr del sustrato y el dominio SH3 se une a una región interna rica en prolina, impidiendo la unión enzima-sustrato productiva; de este modo el enzima se autoinhibe. **(b)** En la forma activa de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) un dominio de unión de Ⓟ-Ser interno está disponible para unir un residuo Ⓟ-Ser en su sustrato (glucógeno sintasa), y de este modo posicionar la quinasa para que fosforile residuos Ser vecinos (parte superior). La fosforilación de un residuo Ser interno permite que este segmento interno de la quinasa ocupe el sitio de unión de Ⓟ-Ser, lo que bloquea la unión de sustrato (parte inferior).

un residuo Ser de su dominio autoinhibidor (Fig. 12-25b). La desfosforilación de este dominio libera al enzima para unirse (y a continuación fosforilar) a sus proteínas diana.

Además de los tres residuos que se fosforilan normalmente en las proteínas, existe una cuarta estructura fosforilada que hace de núcleo para la formación de complejos supramoleculares de las proteínas de señalización: el grupo fosforilado de cabeza de los fosfatidilinositoles de la membrana. Muchas proteínas de señalización contienen dominios tales como SH3 y PH (pleckstrin homology domain; dominio de homología de la pleckstrina) que se unen fuertemente al PIP_3 que sobresale en el lado citosólico de la membrana plasmática. Dondequiera que el enzima PI3K cree este grupo (tal como lo hace en respuesta a la señal de la insulina), las proteínas que se unen se agruparán en la superficie de la membrana.

La mayoría de proteínas que intervienen en la señalización en la membrana plasmática tienen uno o más dominios de fijación de proteína o fosfolípido; muchas tienen tres o más por lo que son polivalentes en sus interacciones con otras proteínas de señalización. En la **Figura 12-26** se muestran algunas de entre las muchas proteínas polivalentes que se sabe que participan en la señalización. Muchos de estos complejos contienen componentes con dominios de fijación a la membrana. Dada la localización de tantos procesos de señalización en la superficie interna de la membrana plasmática, las moléculas que han de colisionar para producir la respuesta de señalización están confinadas de manera efectiva en un espacio bidimensional: la superficie de la membrana. Aquí las colisiones son mucho más probables que en el espacio tridimensional del citosol.

En resumen, a partir de estudios de muchas proteínas de señalización y de los múltiples dominios de unión que contienen ha emergido un cuadro extraordinario. Una señal inicial produce la fosforilación del receptor o de una proteína diana, desencadenando la formación de grandes complejos multiproteicos, unidos sobre armazones formados por proteínas adaptadoras con capacidades de fijación polivalentes. Algunos de estos complejos tienen diversas proteína quinasas que, a su vez, se activan secuencialmente, produciendo una cascada de fosforilación y una gran amplificación de la señal inicial. Las interacciones entre las quinasas de la cascada no se dejan al capricho de colisiones al azar en el espacio tridimensional. En la cascada MAPK, por ejemplo, una proteína del armazón, KSR, une las tres quinasas (MAPK; MAPKK y MAPKKK), asegurando su proximidad y orientación correcta, confiriendo incluso propiedades alostéricas a las interacciones entre las quinasas, lo que hace que su fosforilación en serie sea sensible a estímulos muy pequeños **(Fig. 12-27)**.

Fosfotirosina fosfatasas eliminan el fosfato de residuos Ⓟ-Tyr, invirtiendo el efecto de la fosforilación. En el genoma humano hay al menos 37 genes que codifican fosfotirosina fosfatasas (PTP). Aproximadamente la mitad son proteínas integrales tipo receptor con un único dominio transmembrana; otras están controladas, probablemente, por factores extracelulares todavía sin identificar. Otras PTPasas son solubles y contienen dominios SH2 que determinan sus ligandos moleculares y su localización intracelular. Además, las células animales tienen proteína Ⓟ-Ser y Ⓟ-Thr fosfatasas que invierten los efectos de proteína quinasas específicas de Ser y Thr. Podemos ver, por tanto, que la señalización tiene lugar en **circuitos proteicos**, estrechamente conectados desde el receptor de la señal hasta el efector de la respuesta con la capacidad de desconectarse de manera instantánea por hidrólisis de un simple enlace éster fosfato. En estos circuitos, las proteína quinasas son los escritores, los dominios como SH2 los lectores y las PTP y otras fosfatasas, los borradores.

La polivalencia de las proteínas de señalización permite la formación de muchas combinaciones diferentes de módulos de señalización; cada una de estas combinaciones está adaptada a señales, tipos celulares y circunstancias metabólicas concretas lo que proporciona diversos circuitos de señalización de complejidad extraordinaria.

Las balsas de membrana y las caveolas segregan proteínas de señalización

Las balsas de membrana (Capítulo 11) son regiones de la bicapa de la membrana enriquecidas en esfingolípi-

dos, esteroles y ciertas proteínas, entre ellas muchas que están unidas a la bicapa mediante anclas de GPI (*g*lycosilated derivatives of *p*hosphatidyl*i*nositol, derivados glicosilados de fosfatidilinositol). El receptor β-adrenérgico está segregado en balsas que contienen proteínas G, adenilil ciclasa, PKA y una proteína fosfatasa específica, PP2 que, conjuntamente, constituyen una unidad de señalización altamente integrada. Al segregarse en una pequeña región de la membrana plasmática todos los elementos necesarios para responder a una señal y también finalizarla, la célula puede producir la formación altamente localizada y breve de segundo mensajero.

Algunas RTK (EGFR y PDGFR) parecen estar localizadas en balsas por lo que este secuestro es muy probable que sea funcionalmente significativo. En fibroblastos aislados el EGFR está concentrado normalmente en balsas especializadas denominadas caveolas (véase la Fig. 11-20). Cuando las células se tratan con EGF, el receptor abandona la balsa, separándolo de otros componentes de la ruta señalizadora del EGF. Esta migración depende de la actividad proteína quinasa del receptor; los receptores mutantes que carecen de esta actividad permanecen en las balsas durante el tratamiento con EGF. Estos experimentos sugieren que la segregación espacial de proteínas de señalización en balsas añade una nueva dimensión a los ya complejos procesos iniciados por señales extracelulares.

RESUMEN 12.6 Proteínas adaptadoras polivalentes y balsas de membrana

- Muchas proteínas de señalización tienen dominios que unen residuos Tyr, Ser o Thr fosforilados de otras proteínas; la especificidad de unión de cada dominio viene determinada por secuencias adyacentes al residuo fosforilado en el sustrato.
- Los dominios SH2 y PTB se unen a proteínas que contienen residuos Ⓟ-Tyr; otros dominios unen residuos Ⓟ-Ser y Ⓟ-Thr en diversos contextos.

Los dominios SH3 y PH se unen al fosfolípido de membrana PIP_3.

- Muchas proteínas de señalización son polivalentes con varios módulos de unión diferentes. Al combinar la especificidad de sustrato de diversas proteína quinasas con la especificidad de dominios que unen residuos Ser, Thr o Tyr fosforilados y con fosfatasas que pueden inactivar rápidamente una ruta de señalización, las células crean un gran número de complejos de señalización multiproteicos.
- Las balsas de membrana y las caveolas secuestran grupos de proteínas de señalización en pequeñas regio-

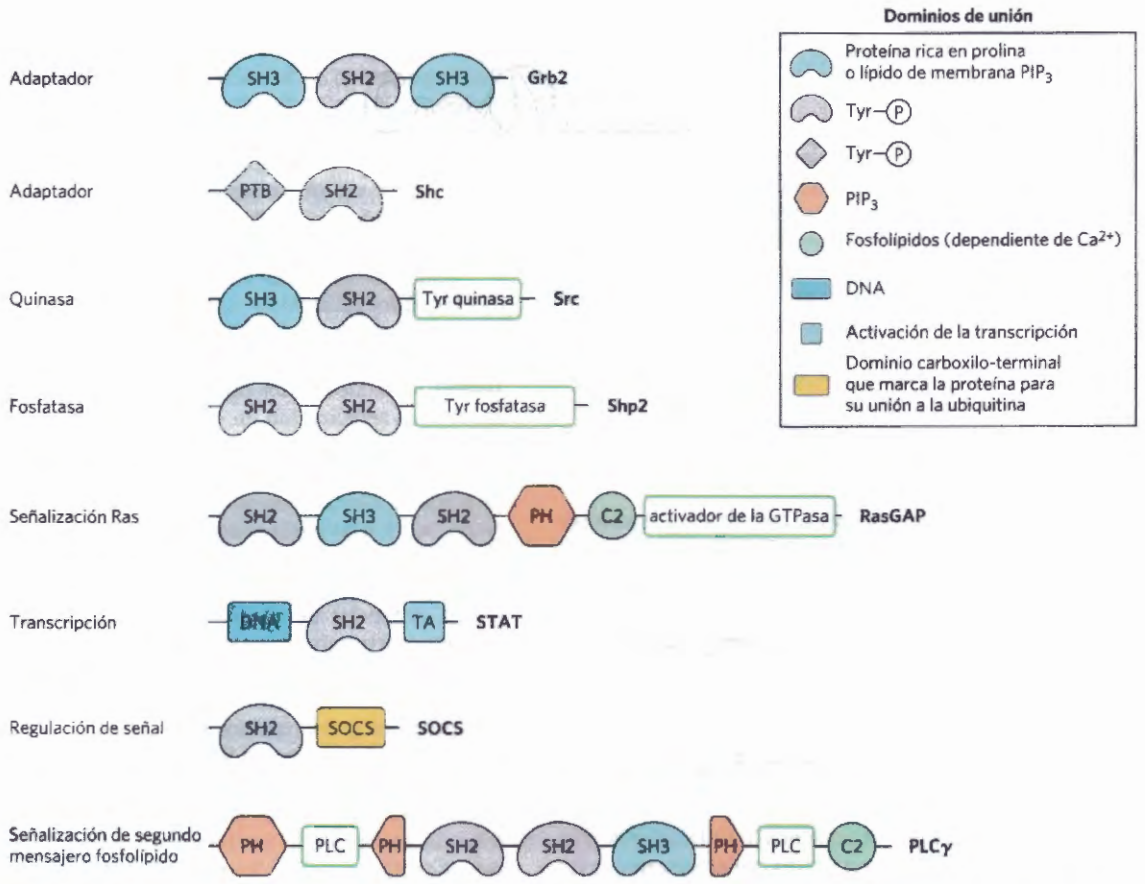


FIGURA 12-26 Algunos módulos de unión de proteínas señalizadoras. Cada proteína está representada por una línea (con el extremo amino a la izquierda); los símbolos indican la localización de dominios de unión conservados (con las especificidades que se dan en la clave; las abreviaturas se explican en el texto); los recuadros verdes indican actividades catalíticas. El nombre de cada proteína aparece en su extremo carboxilo-terminal. Estas proteínas de señalización interaccionan con proteínas fosforiladas o fosfolípidos en muchas permutaciones y combinaciones para formar complejos de señalización integrados. [Fuente: Información de T. Pawson et al., *Trends Cell Biol.* 11:504, 2001, Fig. 5.]

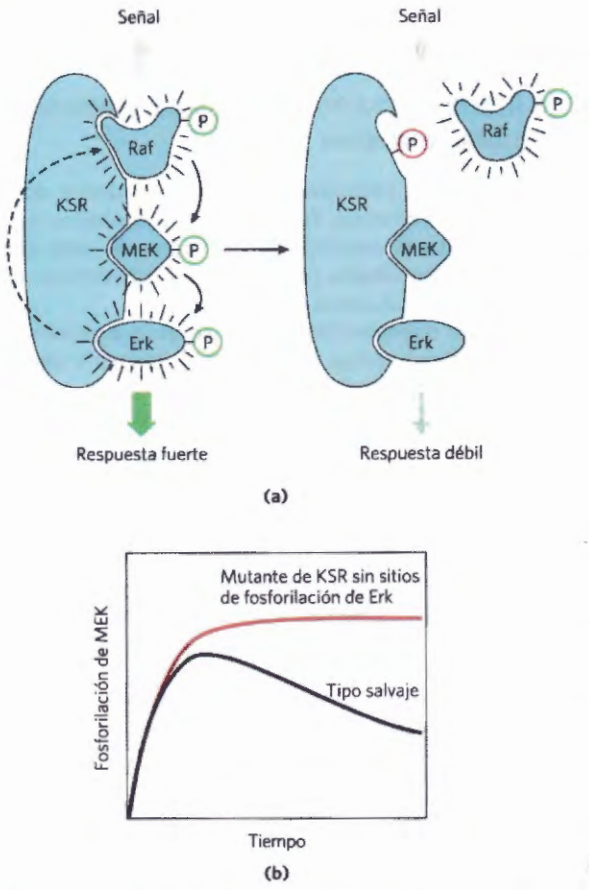


FIGURA 12-27 Una proteína armazón de la levadura que organiza y regula una cascada de proteína quinasas. (a) La proteína de armazón KSR tiene sitios de unión para las tres quinasas de la cascada Raf/MEK/Erk. Al fijar las tres con la orientación adecuada, el armazón establece interacciones entre las proteínas de forma rápida y eficiente. Cuando se ha activado Erk (izquierda), fosforila el sitio de unión de Raf (derecha) forzando un cambio de conformación que desplaza Raf con lo que se impide la fosforilación de MEK. El resultado de esta regulación por retroalimentación es que la fosforilación de MEK es pasajera. **(b)** En las células de levadura con una mutación en KSR en la que faltan los sitios de fosforilación (curva roja), no hay retroalimentación con lo que se produce un patrón de señalización con una temporización diferente. [Fuente: Información de M.C. Good et al., *Science* 332:680, 2011, Fig. 2E.]

nes de la membrana plasmática favoreciendo sus interacciones y haciendo que la señalización sea más eficiente.

12.7 Canales iónicos de compuerta regulada

Los canales iónicos son el fundamento de la señalización eléctrica en células excitables

Ciertas células de los organismos multicelulares son "excitables": pueden detectar una señal externa, convertirla en una señal eléctrica (de modo específico, un cambio en el potencial de membrana) y transmitirla. Las células excitables tienen papeles centrales en la conducción nerviosa, contracción muscular, secreción hormonal, procesos sensoriales y en el aprendizaje y la memoria. La excitabilidad de las células sensoriales, neuronas y miocitos depende de canales iónicos, transductores de señal que proporcionan una vía regulada para el movimiento de iones inorgánicos tales como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^- a través de la membrana plasmática en respuesta a diversos estímulos. Recuerde del Capítulo 11 que estos canales iónicos son "de entrada regulada" ("*gated*"); pueden estar abiertos o cerrados según si el receptor asociado ha sido activado por la unión de su ligando específico (un neurotransmisor, por ejemplo) o por un cambio en el potencial eléctrico transmembrana. La Na^+K^+ ATPasa es electrogénica; crea un desequilibrio de carga a través de la membrana plasmática al transportar 3 Na^+ al exterior de la célula por cada 2 K^+ que introduce **(Fig. 12-28a)**. La acción de la ATPasa hace que el interior de la célula sea negativo con respecto al exterior. Dentro de la célula, la $[K^+]$ es muy superior y la $[Na^+]$ es muy inferior a los valores del exterior (Fig. 12-28b). La dirección del flujo espontáneo de un ion a través de una membrana polarizada lo dicta el potencial electroquímico de dicho ion a través de la membrana que tiene dos componentes: la diferencia de concentración del ion a ambos lados de la membrana y la diferencia de potencial eléctrico (V_m), expresada normalmente en milivolts (véase la Ec 11-4, p. 413). Dada la diferencia de concentración de iones y una V_m de aproximadamente -60mV (con el interior negativo), la apertura de un canal de Na^+ o Ca^{2+} producirá un flujo espontáneo hacia el interior de Na^+ o Ca^{2+} (y la despolarización), mientras que la apertura de un canal de K^+ producirá un flujo espontáneo de K^+ hacia el exterior (y la hiperpolarización) (Fig. 12-28b). En este caso, el K^+ se mueve hacia el exterior, contra el gradiente eléctrico, porque la gran diferencia de concentración dentro y fuera de la célula ejerce un efecto superior a la V_m. En el caso del Cl^- predomina el potencial de membrana, por lo que el Cl^- fluye hacia fuera cuando se abre un canal de Cl^-.

El número de iones que debe fluir para producir un cambio fisiológicamente significativo del potencial de membrana es despreciable con respecto a las concentraciones de Na^+, K^+ y Cl^- en las células y el fluido extracelular, de modo que los flujos de iones que tienen lugar durante la señalización en células excitables no tienen esencialmente ningún efecto en las concentraciones de dichos iones. Con el Ca^{2+} la situación es diferente; debido a que la $[Ca^{2+}]$ intracelular es generalmente muy baja ($\sim 10^{-7}$ M) el flujo hacia el interior de Ca^{2+} sí puede alterar significativamente la $[Ca^{2+}]$ citosólica, lo que permite que sirva como segundo mensajero.

El potencial de membrana de una célula en un momento determinado es el resultado de los tipos y del número de canales iónicos abiertos en ese instante. La apertura y cierre de los canales iónicos sincronizados con precisión y los cambios transitorios resultantes en el potencial de membrana son la base de la señalización eléctrica por la que el sistema nervioso estimula la contracción de los músculos esqueléticos, el latido del corazón o la liberación del contenido de las células secretoras. Además, muchas hormonas ejercen sus efectos mediante la alteración de los potenciales de membrana de sus células diana. Estos mecanismos no están limitados a los animales; los canales iónicos juegan papeles importantes en las respuestas de las bacterias, protistas y plantas a señales medioambientales.

Para ilustrar la acción de los canales iónicos en la señalización de célula a célula, describimos ahora los mecanismos por los que una neurona pasa una señal a lo largo de su longitud y a través de la sinapsis hacia la siguiente neurona (o a un miocito) en un circuito celular, utilizando acetilcolina como neurotransmisor.

Los canales iónicos de compuerta regulada por voltaje producen potenciales de acción neuronales

La señalización en el sistema nervioso se consigue mediante redes de neuronas, células especializadas que transportan un impulso eléctrico (potencial de acción) desde un extremo de la célula (el cuerpo celular) a través de una extensión citoplasmática alargada (el axón). La señal eléctrica desencadena la liberación de moléculas de neurotransmisor en la sinapsis que transportan la señal a la siguiente célula del circuito. Tres tipos de **canales iónicos de entrada regulada por voltaje** son esenciales para este mecanismo de señalización. A lo largo de toda la longitud del axón hay **canales de Na^+ de entrada regulada por voltaje (Fig. 12-29)**, que están cerrados cuando la membrana está en reposo (V_m = -60 mV) pero que se abren brevemente cuando la membrana se despolariza localmente en respuesta a acetilcolina (o algún otro neurotransmisor). También distribuidos a lo largo del axón se encuentran **canales de K^+ de entrada regulada por voltaje** que se abren inmediatamente después en respuesta a la despolarización inducida cuando se abren canales de Na^+ próximos. El flujo despolarizante de Na^+ al interior del axón (entrada) es, pues, rápidamente contrarrestado por un flujo repolarizante de K^+ hacia afuera (salida). En el extremo distal del axón hay **canales de Ca^{2+} de entrada regulada por voltaje** que se abren cuando llega la onda de despolarización (paso ❶) y repolarización (paso ❷) producida por la actividad de los canales de Na^+ y K^+, desencadenando entonces la liberación del neurotransmisor acetilcolina, el cual lleva la señal a otra neurona (¡desencadene un potencial de acción!) o a una fibra muscular (¡contráigase!).

Los canales de Na^+ regulados por voltaje son muy selectivos para el Na^+ sobre otros cationes (en un factor de 100 o más) y tienen una velocidad de flujo muy elevada (>10^7 iones/s). Un canal de Na^+ que se abre en respuesta a una reducción en el potencial eléctrico transmembrana se cierra en el lapso de milisegundos y no se puede volver a abrir hasta pasados muchos milisegundos. El flujo de Na^+ hacia el interior a través de los canales de Na^+ abiertos despolariza localmente la membrana, haciendo que los canales de K^+ regulados por voltaje se abran (Fig. 12-29, paso ❶). El flujo resultante de K^+ hacia el exterior repolariza localmente la membrana, reestableciendo el potencial de membrana negativo en el interior (paso ❷). (La estructura y el mecanismo de los canales de K^+ regulados por voltaje se discuten con más detalle en la Sección 11.3; véanse las Figs. 11-45 y 11-46). Un pulso breve de despolarización recorre así el axón a medida que la despolarización local dispara la breve apertura de los canales de Na^+ vecinos, y luego la de los canales de K^+. Después de cada apertura de un canal de Na^+, le sigue un corto período refractario durante el cual este canal no se puede volver a abrir, lo que asegura que una onda de despolarización unidireccional, el potencial de acción, se desplace desde el cuerpo de la célula nerviosa hacia el extremo del axón.

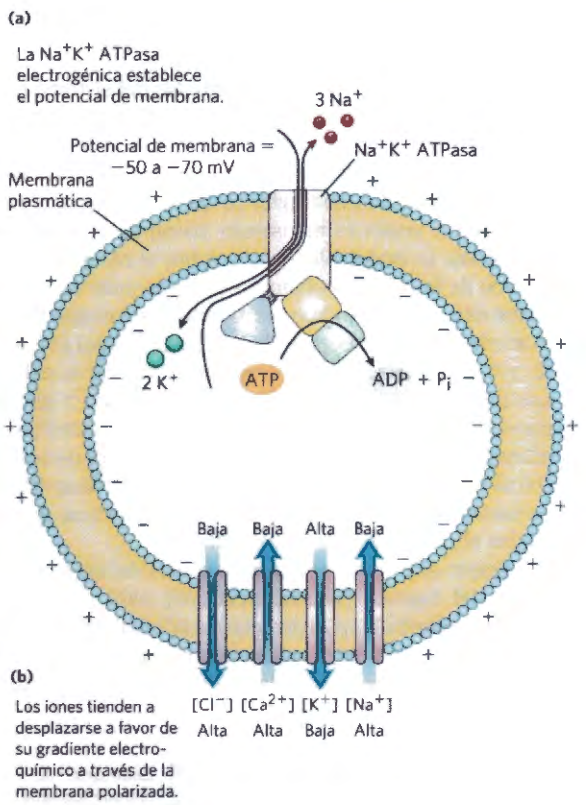


FIGURA 12-28 Potencial eléctrico transmembrana. **(a)** La Na^+K^+ ATPasa electrogénica produce un potencial eléctrico transmembrana de -60 mV (negativo en el interior). **(b)** Las flechas azules muestran la dirección en la que los iones tienden a moverse espontáneamente a través de la membrana plasmática en una célula animal, impulsados por la combinación de gradientes químicos y eléctricos. El gradiente químico impulsa Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior (produciendo despolarización) y K^+ hacia el exterior (produciendo hiperpolarización). El gradiente eléctrico impulsa Cl^- hacia el exterior, en contra de su gradiente de concentración (produciendo despolarización).

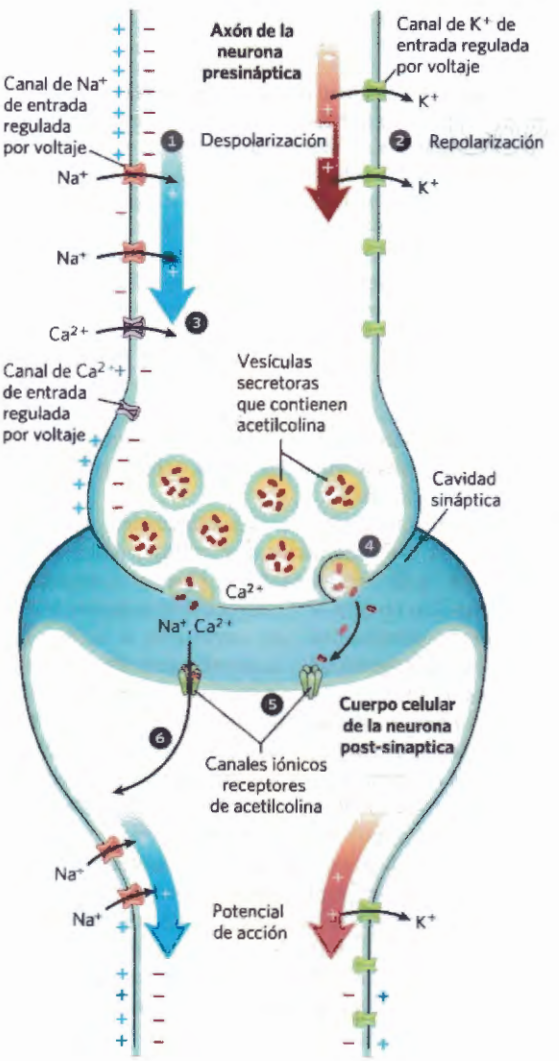
Cuando la onda de despolarización alcanza los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, éstos se abren (paso ❸) y el Ca^{2+} entra desde el espacio extracelular. La elevación en la [Ca^{2+}] citoplasmática provoca la liberación de acetilcolina por exocitosis a la hendidura pos-sináptica (paso ❹). La acetilcolina difunde hacia la célula pos-sináptica (otra neurona o un miocito), donde se une a los receptores de acetilcolina y provoca la despolarización (descrito más adelante). Así el mensaje pasa a la siguiente célula del circuito. Vemos, entonces, que los canales iónicos regulados por compuerta transmiten señales por una de estas dos vías: mediante la alteración de la concentración citoplasmática de un ion (tal como el Ca^{2+}), que actúa entonces como segundo mensajero intracelular, o bien por un cambio de V_m que afecta a otras proteínas de membrana que son sensibles al V_m. El paso de una señal eléctrica a través de una neurona y de ella a la siguiente ilustra ambos tipos de mecanismo.

Las neuronas tienen canales receptores que responden a diferentes neurotransmisores

Las células animales, especialmente las del sistema nervioso, contienen diferentes canales iónicos de entrada regulada por ligandos, voltaje o ambos. Los receptores que son en sí mismos canales iónicos se clasifican como **ionotrópicos** para distinguirlos de los receptores que generan un segundo mensajero (receptores **metabotrópicos**). La acetilcolina actúa sobre el receptor ionotrópico de la célula postsináptica El receptor de acetilcolina es un canal de cationes. Cuando está ocupado por la acetilcolina, el receptor abre el paso a cationes (Na^+, K^+ y Ca^{2+}), induciendo la despolarización de la célula. Los neurotransmisores serotonina, glutamato y glicina pueden actuar a través de receptores ionotrópicos estructuralmente relacionados con el receptor de acetilcolina La serotonina y el glutamato provocan la apertura de canales catiónicos (K^+, Na^+, Ca^{2+}), mientras que la glicina abre canales de Cl^- específicos.

Según sea el ion que pasa a través de un canal, la unión del ligando (neurotransmisor) para este canal bien despolariza bien hiperpolariza la célula diana. Una sola neurona recibe, normalmente, información de otras muchas neuronas, cada una de las cuales libera su propio neurotransmisor característico con su efecto despolarizante o hiperpolarizante característico. El V_m de la célula diana refleja, por tanto, la aportación *integrada* (Fig. 12-1e) de múltiples neuronas. La célula responde con un potencial de acción sólo si la aportación integrada llega a una despolarización neta de tamaño suficiente.

Los canales receptores de acetilcolina, glicina, glutamato y ácido γ-aminobutírico (GABA) son de entrada regulada por ligandos *extracelulares*. Los segundos mensajeros *intracelulares*, tales como cAMP, cGMP, IP_3, Ca^{2+}, y ATP, regulan canales iónicos de la clase que vimos en las transducciones sensoriales de la visión, del olfato y del gusto.



Las toxinas apuntan a los canales iónicos

Un gran número de las toxinas más potentes que se encuentran en la naturaleza actúan sobre canales iónicos. Por ejemplo, la dendrotoxina (de la serpiente mamba negra) bloquea la acción de canales de K^+ regulados por voltaje, la tetrodoxina (producida por el pez soplador) actúa sobre canales de Na^+ regulados por voltaje y la cobrotoxina inutiliza los canales iónicos de los receptores de acetilcolina. ¿Por qué en el curso de la evolución los canales iónicos se han convertido en la diana preferida de las toxinas en lugar de alguna diana metabólica crítica tal como un enzima esencial en el metabolismo energético?

Los canales iónicos son amplificadores extraordinarios; la apertura de un solo canal permite el flujo de 10 millones de iones por segundo. En consecuencia, se necesitan relativamente pocas moléculas de una proteína de un canal iónico por neurona para señalizar funcio-

FIGURA 12-29 Papel de los canales iónicos de entrada regulada por voltaje y por ligando en la transmisión neuronal. Inicialmente, la membrana plasmática de la neurona presináptica está polarizada (interior negativo) a través de la acción de la Na^+K^+ ATPasa electrogénica, que bombea 3 Na^+ hacia fuera por cada 2 K^+ bombeados hacia el interior (véase la Fig. 12-28). ❶ Un estímulo a esta neurona (no mostrado) provoca que un potencial de acción se desplace a lo largo del axón (flecha azul), lejos del cuerpo celular. La apertura de un canal de Na^+ regulado por voltaje ❷ permite la entrada de Na^+, y la despolarización local resultante provoca la apertura del canal de Na^+ adyacente, y así sucesivamente. La direccionalidad de movimiento del potencial de acción está asegurada por el corto período refractario que sigue a la apertura de cada canal de Na^+ de entrada regulada por voltaje. Instantes después de que el potencial de acción pase un punto en el axón, se abren canales de K^+ regulados por voltaje, lo que permite la salida de K^+ y con ello la repolarización de la membrana (flecha roja) dejándola lista para el próximo potencial de acción. (Observe que, por motivos de claridad los canales de Na^+ y de K^+ se han dibujado en lados opuestos del axón; ambos tipos de canales están distribuidos uniformemente en la membrana axonal). ❸ Cuando la onda de despolarización alcanza el extremo del axón, se abren canales de Ca^{2+} regulados por voltaje lo que permite la entrada de Ca^{2+}.

❹ El incremento resultante de la $[Ca^{2+}]$ interna provoca la liberación exocítica del neurotransmisor acetilcolina a la cavidad sináptica. ❺ La acetilcolina se une a un receptor en la neurona pos-sináptica (o en un miocito), provocando la apertura de su canal iónico de entrada regulada por ligando. ❻ Na^+ y Ca^{2+} extracelulares entran a través de este canal, despolarizando la célula pos-sináptica. La señal eléctrica ha pasado de este modo al cuerpo celular de la neurona pos-sináptica y se desplazará a lo largo de su axón hacia una tercera neurona (o un miocito) con esta misma secuencia de acontecimientos.

nes. Esto significa que un número relativamente pequeño de moléculas de toxina con gran afinidad hacia los canales iónicos, actuando desde el exterior de la célula, pueden tener un efecto muy pronunciado sobre la neuroseñalización en todo el cuerpo. Un efecto comparable a través de un enzima del metabolismo, presente normalmente en las células a concentraciones mucho más elevadas que los canales iónicos, necesitaría muchas más moléculas de toxina.

RESUMEN 12.7 Canales iónicos de compuerta

- Los canales iónicos de compuerta regulados por ligandos o por potencial de membrana son de gran importancia para la señalización en neuronas y otras células.
- Los canales de Na^+ y K^+ de compuerta regulada por voltaje de las membranas neuronales transportan el potencial de acción a lo largo del axón en forma de onda de despolarización (entrada de Na^+) seguido de la repolarización (salida al exterior de K^+).
- La llegada de un potencial de acción al extremo distal de una célula presináptica desencadena la liberación del neurotransmisor. El neurotransmisor (acetilcolina, por ejemplo) difunde a la neurona pos-sináptica (o al miocito en una unión neuromuscular), se une a receptores específicos en la membrana plasmática, y desencadena un cambio en V_m.
- Las neurotoxinas producidas por muchos organismos atacan canales iónicos neuronales, por lo que actúan rápida y letalmente.

12.8 Regulación de la transcripción por receptores nucleares de hormonas

Los esteroides, el ácido retinoico (retinoide), y las hormonas tiroideas forman un amplio grupo de hormonas (ligandos de receptores) que ejercen sus efectos, al menos en parte, por un mecanismo esencialmente diferente del de otras hormonas: actúan en el núcleo alterando la expresión génica. Discutiremos su modo de acción en detalle en el Capítulo 28, junto con otros mecanismos que regulan la expresión génica. Aquí sólo haremos una breve presentación.

Las hormonas esteroideas (estrógeno, progesterona, y cortisol, por ejemplo), demasiado hidrofóbicas para disolverse fácilmente en la sangre, son transportadas por proteínas portadoras específicas desde su punto de liberación hasta sus tejidos diana. En las células diana, estas hormonas pasan a través de la membrana plasmática por simple difusión y se unen a proteínas receptoras específicas en el núcleo **(Fig.12-30)**. La unión de la hormona desencadena cambios en la conformación de una proteína receptora y de esta forma es capaz de interaccionar con secuencias reguladoras específicas de DNA llamadas **elementos de respuesta a hormonas (HRE)**, alterando así la expresión génica (véase la Fig. 28-33). El complejo receptor-hormona unida intensifica la expresión de genes específicos adyacentes a HRE con la ayuda de otras proteínas esenciales para la transcripción. Se requieren horas o días para que estos reguladores tengan un efecto completo,

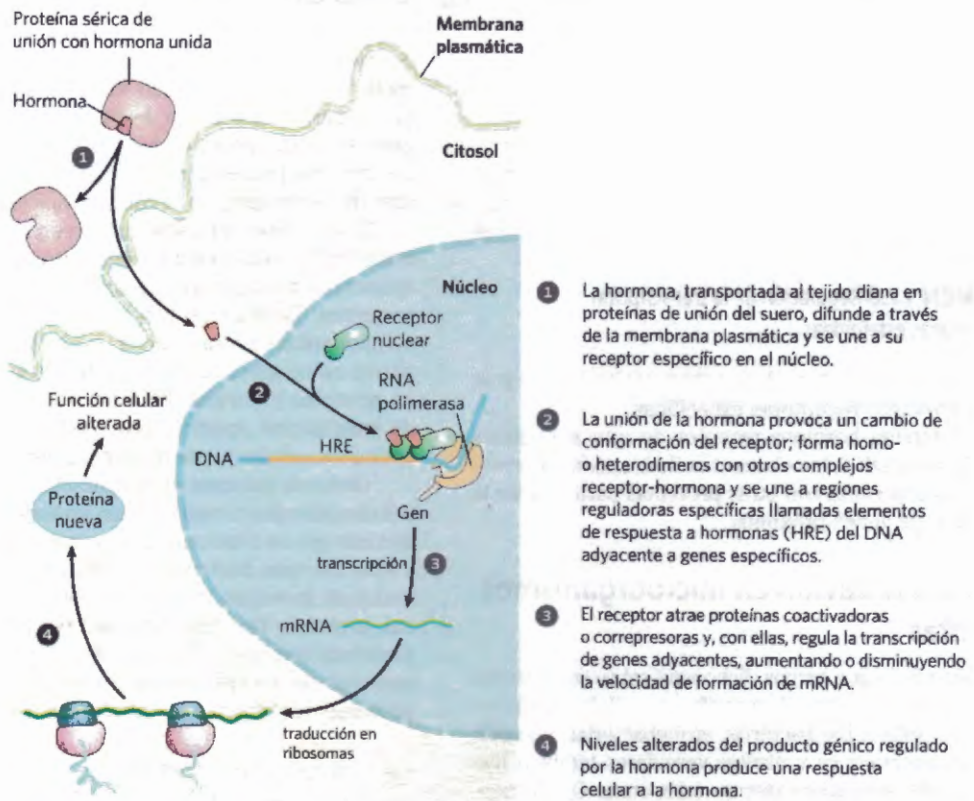
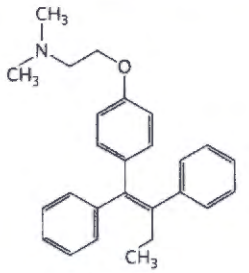


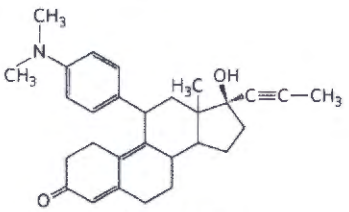
FIGURA 12-30 Mecanismo general por el que las hormonas esteroideas y tiroideas, retinoides, y vitamina D regulan la expresión génica. Los detalles de la transcripción y síntesis de proteínas se discuten en los Capítulos 26 y 27. Algunos esteroides también actúan a través de receptores de la membrana plasmática por un mecanismo completamente diferente.

el tiempo requerido para que los cambios en la síntesis de RNA y la posterior síntesis de proteínas sean evidentes en forma de un metabolismo alterado.

La especificidad de la interacción esteroide-receptor se explota en el uso del fármaco **tamoxifeno** para tratar el cáncer de mama. En algunos tipos de cáncer de mama, la división de las células cancerosas depende de la presencia continua de estrógeno. El tamoxifeno es un antagonista del estrógeno; compite con el estrógeno para unirse al receptor de estrógeno, pero el complejo tamoxifeno-receptor no tiene efecto, o muy poco, en la expresión génica. En consecuencia, la administración de tamoxifeno tras cirugía o durante la quimioterapia del cáncer de mama dependiente de hormonas detiene o hace más lento el crecimiento de las células cancerosas restantes. Otro análogo de esteroide, el fármaco **mifepristone (RU486),** se une al receptor de progesterona y bloquea acciones de la hormona que son esenciales para la implantación del óvulo fertilizado en el útero. De este modo actúa como contraceptivo.



Tamoxifeno



Mifepristone
(RU486)

RESUMEN 12.8 Regulación de la transcripción por hormonas esteroideas

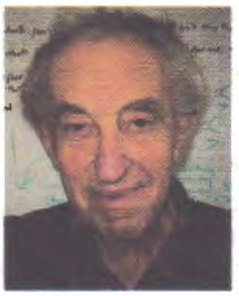
- Las hormonas esteroideas entran en las células y se unen a proteínas receptoras específicas.
- El complejo hormona-receptor se une a regiones específicas de DNA, los elementos de respuesta hormonales, e interacciona con otras proteínas para regular la expresión de genes próximos.

12.9 Señalización en microorganismos y plantas

Gran parte de lo que hemos dicho aquí sobre señalización hace referencia a tejidos de mamíferos o células de dichos tejidos en cultivo. Las bacterias, arquebacterias, microorganismos eucarióticos y plantas vasculares también han de responder a señales externas tales como O_2, nutrientes, luz, productos químicos nocivos, etc. Consideraremos ahora de forma breve las clases de maquinaria de señalización que utilizan los microorganismos y las plantas.

La señalización bacteriana necesita la fosforilación en un sistema de dos componentes

En unos estudios pioneros sobre la quimiotaxis en bacterias, Julius Adler demostró que *Escherichia coli* responde a los nutrientes de su entorno, entre ellos azúcares y aminoácidos, nadando hacia ellos impulsada por flagelos de la superficie. Una familia de proteínas de membrana tienen dominios de unión en el exterior de la membrana plasmática a la que se unen **atractivos** (azúcares o aminoácidos) **(Fig. 12-31)**. La señal es transmitida por el denominado **sistema de dos componentes** El primer componente es la **histidina quinasa del receptor** que, en respuesta a la unión del ligando, fosforila un residuo His de su dominio citoplasmático y a continuación cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el residuo His a un residuo Asp en el segundo componente, una proteína soluble denominada **regulador de respuesta**. Esta fosfoproteína se desplaza a la base del flagelo transportando la señal del receptor de membrana. El flagelo está impulsado por un motor rotatorio que puede impulsar a la célula a través del medio o hacer que se pare, según sea la dirección de rotación del motor. El cambio en la concentración de atractivo durante el tiempo, señalada a través del receptor, permite que la célula determine si se desplaza hacia o lejos del atractivo. Si su movimiento es hacia el atractivo, el regulador de respuesta señala a la célula que continúe en línea recta; si es alejándose de él, la célula da un tumbo momentáneo cambiando de dirección. La repetición de este comportamiento da lugar a una trayectoria aleatoria, con una propensión por un movimiento en la dirección de incremento en la concentración de atractivo.


Julius Adler
[Fuente: Cortesía de Hildegard Wohl Adler.]

E. coli detecta no sólo azúcares y aminoácidos, sino también O_2, extremos de temperatura y otros factores ambientales utilizando este sistema básico de dos componentes. También se han detectado sistemas de dos componentes en otras muchas bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas y arquebacterias así como en protistas y hongos. Está claro que este mecanismo de señalización apareció pronto en el transcurso de la evolución celular y que se ha conservado.

Diversos sistemas de señalización utilizados por las células animales tienen también análogos en bacterias. A medida que se conocen los genomas completos de más, y más diversas, bacterias, se han descubierto genes que codifican proteínas similares a proteína Ser o Thr quinasas, proteínas tipo Ras reguladas por la unión de GTP y proteínas con dominios SH3. No se han detectado Tyr quinasas de receptores en bacterias, pero en algunas proteínas bacterianas se encuentran residuos Ⓟ-Tyr.

Los sistemas de señalización en plantas tienen algunos de los componentes utilizados por microbios y mamíferos

Al igual que los animales, las plantas vasculares han de tener un medio de comunicación entre tejidos para

coordinar y dirigir el crecimiento y el desarrollo; para adaptarse a las condiciones de O_2, nutrientes, luz, temperatura y disponibilidad de agua y para alertar de la presencia de compuestos químicos nocivos y patógenos dañinos. Han pasado al menos mil millones de años de evolución desde que divergieron las ramas de las plantas y de los animales en los eucariotas, lo que se refleja en las diferencias de los mecanismos de señalización: algunos mecanismos de plantas se han conservado, es decir son similares a los de los animales (proteína quinasas, proteínas adaptadoras, nucleótidos cíclicos, bombas iónicas electrogénicas y canales iónico de entrada regulada); algunos son similares a los sistemas bacterianos de dos componentes, mientras que otros son propios de las plantas (mecanismos sensores de la luz que reflejan cambios estacionales en el ángulo y, por tanto, en el color de la luz solar, por ejemplo). El genoma de la planta *Arabidopsis thaliana* codifica unas 1.000 proteína Ser/Thr quinasas, entre las que hay unas 60 MAPK y cerca de 400 receptor quinasas asociadas a membrana que fosforilan residuos Ser o Thr; diversas proteína fosfatasas; proteínas adaptadoras que forman armazones en los que se reúnen proteínas de complejos de señalización; enzimas para la síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos y 100 o más canales iónicos de entre los que unos 20 son de entrada regulada por nucleótidos cíclicos. Se encuentran presentes inositol fosfolípidos, así como quinasas que los interconvierten por fosforilación de los grupos inositol de la cabeza. Aun aceptando el hecho que *Arabidopsis* tiene múltiples copias de muchos genes, la presencia de esta gran cantidad de genes refleja la existencia de una amplia gama de potencial señalizador

Algunos tipos de proteínas de señalización comunes en tejidos animales están ausentes de las plantas o están representados sólo por unos pocos genes. Las proteína quinasas dependientes de nucleótido cíclico (PKA y PKG), por ejemplo, parecen estar ausentes. Los genes de las proteínas G heterotriméricas y de la proteína Tyr quinasa son mucho menos prominentes en el genoma de las plantas y el modo de acción de estas proteínas es diferente del que tienen en células animales. La familia de proteínas más abundante en el genoma humano, los GPCR, están ausentes del genoma de plantas. Los receptores nucleares de esteroides de unión a DNA no son, ciertamente, prominentes y pueden estar ausentes de las plantas. Aunque los vegetales carecen del mecanismo más conservado de percepción de la luz presente en los animales (la rodopsina, con el retinal como pigmento), poseen una rica colección de otros mecanismos de detección de la luz que no se encuentran en los tejidos animales como, por ejemplo, los fotocromos y los criptocromos (Capítulo 20).

RESUMEN 12.9 Señalización en microorganismos y plantas

- Las bacterias y los microorganismos eucarióticos tienen diversos sistemas sensoriales que les permiten analizar su entorno y responder al mismo. En el sistema de dos componentes, una receptor His quinasa percibe la señal y se autofosforila en un residuo His; a continuación fosforila el regulador de respuesta en un residuo Asp.

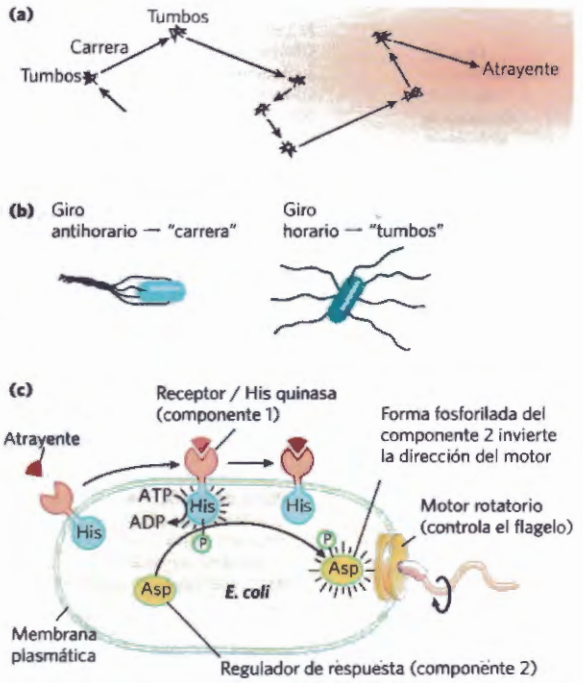


FIGURA 12-31 Mecanismo de señalización de dos componentes en la quimiotaxis bacteriana. (a) Cuando se coloca *E. coli* cerca de una fuente de un atrayente soluble, lleva a cabo un paseo al azar, orientado hacia el atrayente. **(b)** Los flagelos tienen una estructura helicoidal intrínseca y cuando todos los flagelos giran en sentido antihorario, las hélices de los flagelos giran conjuntamente y se mueven concertadamente para propulsar la célula hacia adelante en una "carrera". Cuando los flagelos giran en sentido horario, los haces de flagelos se separan y la célula da tumbos brevemente hasta que se recupera el giro antihorario y la célula empieza a nadar otra vez hacia adelante en una dirección nueva y al azar. Cuando se mueva hacia el atrayente la célula da menos tumbos y, por tanto, carreras más largas; cuando se aleja, los tumbos frecuentes dan como resultado final un movimiento hacia el atrayente. **(c)** La rotación de los flagelos está controlada por un sistema de dos componentes consistente en un receptor histidina quinasa y una proteína efectora. Cuando un ligando atrayente se une al dominio receptor del receptor unido a membrana, se activa una proteína quinasa en el dominio citosólico (componente 1) y se autofosforila en una residuo His. Este grupo fosforilo se transfiere seguidamente a un residuo Asp de un regulador de respuesta (componente 2). Después de la fosforilación el regulador de respuesta se desplaza a la base del flagelo en donde produce un giro antihorario de los flagelos, y por consiguiente una carrera.

- Las plantas responden a muchos estímulos ambientales empleando hormonas y factores de crecimiento para coordinar el desarrollo y las actividades metabólicas de sus tejidos. Los genomas de plantas codifican centenares de proteínas de señalización, que incluyen algunas muy parecidas a las de los mamíferos.
- Las plantas no poseen GPCR ni proteína quinasas activadas por cAMP o cGMP.

12.10 Regulación del ciclo celular por proteína quinasa

Uno de los efectos más espectaculares de las rutas de señalización es la regulación del ciclo celular eucariótico. Durante el crecimiento embrionario, y posterior desarrollo, la división celular tiene lugar prácticamente

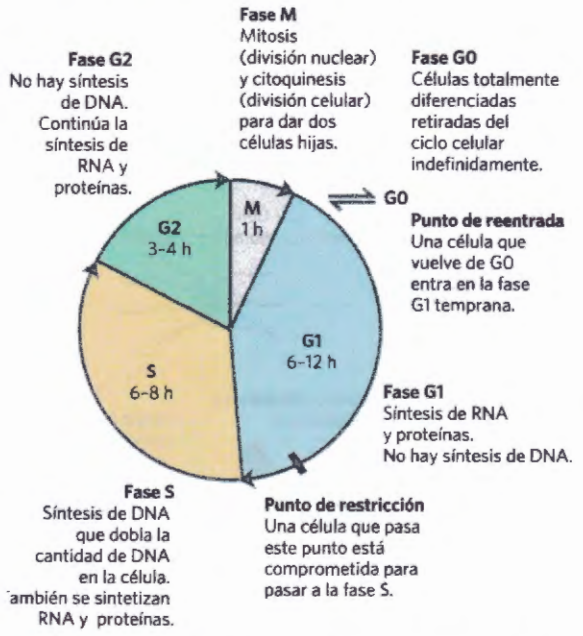


FIGURA 12-32 Ciclo celular eucariota. La duración (en horas) de las cuatro etapas varían, pero las que se muestran son típicas.

en cada tejido. En el organismo adulto muchos tejidos se vuelven inactivos. La "decisión" de una célula de dividirse o no tiene una importancia crucial para el organismo. Cuando los mecanismos reguladores que limitan la división celular son defectuosos y las células experimentan una división incontrolada, el resultado es catastrófico: cáncer. Una correcta división celular requiere una secuencia ordenada y precisa de procesos bioquímicos que asegure a cada célula hija el conjunto completo de las moléculas que requiere para vivir. Investigaciones sobre el control de la división celular en diversas células eucarióticas han puesto de manifiesto unos mecanismos universales de regulación. Los mecanismos de señalización, muy parecidos a los antes descritos, son básicos en la determinación sobre si una célula se divide y, en caso positivo, cuando. También aseguran el paso ordenado a través de las fases el ciclo celular.

El ciclo celular tiene cuatro fases

La división celular que acompaña a la mitosis en eucariotas tiene lugar en cuatro fases bien definidas **(Fig. 12-32)**. En la fase S (síntesis) el DNA se replica y produce copias para las dos células hijas. En la fase G2 (G indica el hueco (en inglés *gap*), entre divisiones), se sintetizan proteínas nuevas y la célula dobla aproximadamente su tamaño. En la fase M (mitosis), la cubierta nuclear materna se rompe, los cromosomas parejos se arrastran hacia polos opuestos de la célula, cada conjunto de cromosomas hijos se rodea por una envoltura nuclear recién formada y la citoquinesis corta la célula por la mitad, produciendo dos células hijas (véase la Fig. 24-23). En el tejido embrionario o en un tejido que prolifera rápidamente cada célula hija se divide de nuevo, pero sólo después de un período de espera (G1). En cultivos de células animales, el proceso completo dura unas 24 horas.

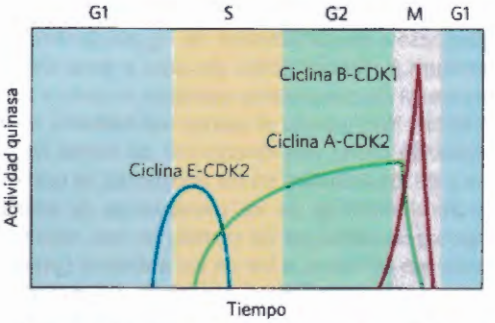


FIGURA 12-33 Variaciones de las actividades de CDK específicas durante el ciclo celular en animales. La actividad ciclina E-CDK2 presenta un máximo cerca de la unión entre las fases G1 y S, cuando el enzima activo inicia la síntesis de los enzimas requeridos para la síntesis de DNA (véase la Fig. 12-37). La actividad ciclina A-CDK2 aumenta durante las fases S y G2, y disminuye drásticamente en la fase M, coincidiendo con el máximo de B-CDK1. La ciclina D es activa mientras esté presente el factor de crecimiento (no mostrado). [Fuente: Dato de J. Pines, *Nature Cell Biol.* 1:E73, 1999.]

Después del paso por mitosis y la entrada en G1, la célula o continua otra división o cesa de dividirse entrando en una fase de latencia (G0) que puede durar horas, días o toda la vida de la célula. Cuando una célula en G0 empieza a dividirse de nuevo, vuelve a entrar en el ciclo de división a través de la fase G1. Las células diferenciadas, tales como los hepatocitos o los adipocitos, han adquirido su función y forma especializadas; permanecen en la fase G0. Las células madre retienen su potencial de división y diferenciación en cualquiera de ciertos tipos celulares

Los niveles de las proteína quinasas dependientes de ciclina experimentan oscilaciones

La temporización del ciclo celular está controlada por una familia de proteína quinasas con actividades que cambian en respuesta a señales celulares. Al fosforilar proteínas específicas a intervalos temporales precisos, estas proteína quinasas dirigen las actividades metabólicas de la célula que producen una división celular ordenada. Estas quinasas son heterodímeros con una subunidad reguladora, **ciclina**, y una unidad catalítica, **proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK)**. En ausencia de ciclina, la subunidad catalítica es prácticamente inactiva. Cuando se une ciclina, se abre el sitio catalítico, un residuo esencial para la catálisis se vuelve accesible y la actividad proteína quinasa de la subunidad catalítica aumenta 10.000 veces. Las células animales tienen al menos diez ciclinas diferentes (designadas A, B y así sucesivamente) y al menos ocho CDK (desde CDK1 a CDK8), que actúan en combinaciones diversas en puntos específicos del ciclo celular. Las plantas también utilizan una familia de CDK para regular su división celular en los meristemos de la raíz y del tallo, principales tejidos en los que se da la división.

En una población de células animales sujetas a una división sincronizada, algunas actividades CDK muestran oscilaciones notables **(Fig. 12-33)**. Estas oscilaciones son el resultado de cuatro mecanismos de regulación de la actividad CDK: fosforilación o desfosforilación de la CDK, degradación controlada de la subunidad

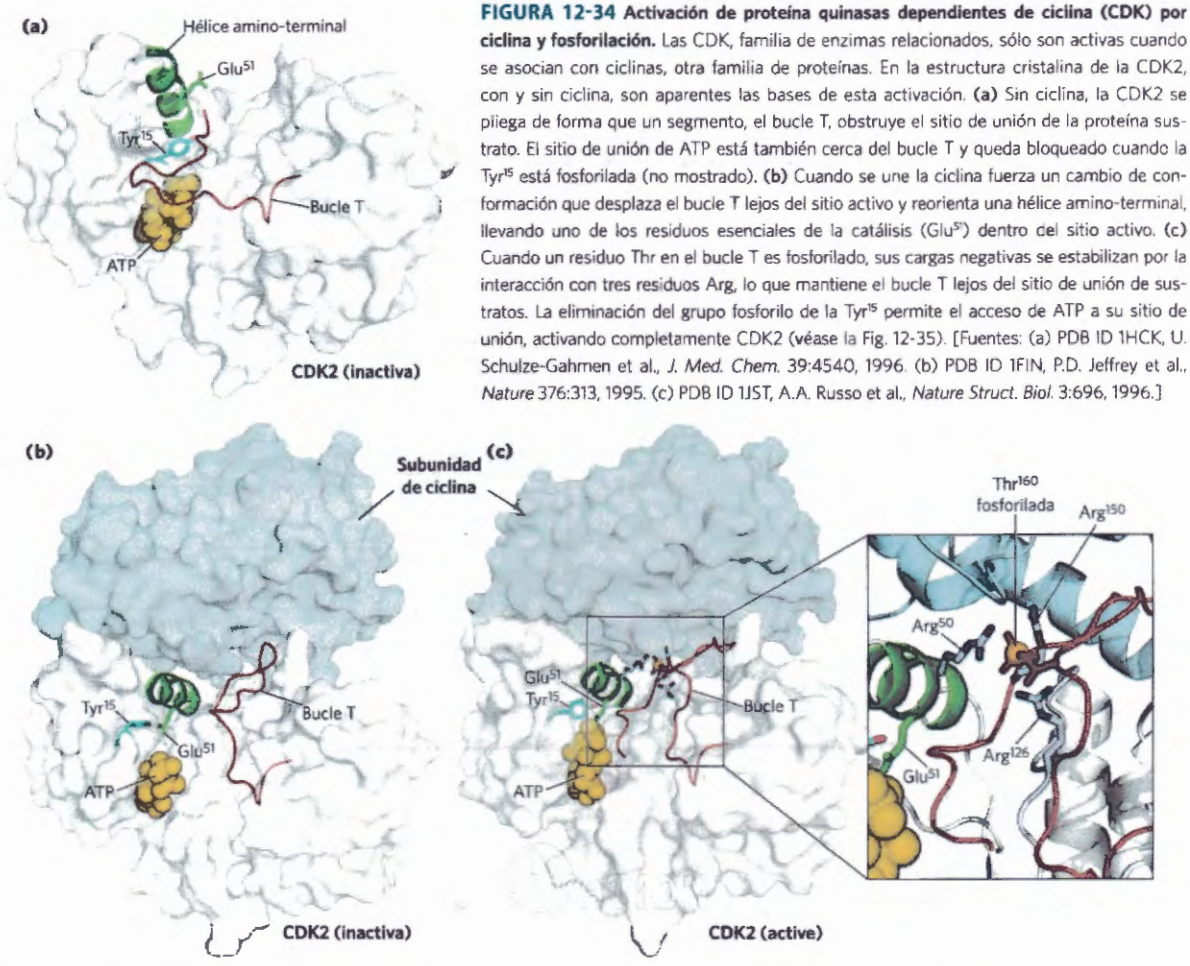


FIGURA 12-34 Activación de proteína quinasas dependientes de ciclina (CDK) por ciclina y fosforilación. Las CDK, familia de enzimas relacionados, sólo son activas cuando se asocian con ciclinas, otra familia de proteínas. En la estructura cristalina de la CDK2, con y sin ciclina, son aparentes las bases de esta activación. **(a)** Sin ciclina, la CDK2 se pliega de forma que un segmento, el bucle T, obstruye el sitio de unión de la proteína sustrato. El sitio de unión de ATP está también cerca del bucle T y queda bloqueado cuando la Tyr^{15} está fosforilada (no mostrado). **(b)** Cuando se une la ciclina fuerza un cambio de conformación que desplaza el bucle T lejos del sitio activo y reorienta una hélice amino-terminal, llevando uno de los residuos esenciales de la catálisis (Glu^{51}) dentro del sitio activo. **(c)** Cuando un residuo Thr en el bucle T es fosforilado, sus cargas negativas se estabilizan por la interacción con tres residuos Arg, lo que mantiene el bucle T lejos del sitio de unión de sustratos. La eliminación del grupo fosforilo de la Tyr^{15} permite el acceso de ATP a su sitio de unión, activando completamente CDK2 (véase la Fig. 12-35). [Fuentes: (a) PDB ID 1HCK, U. Schulze-Gahmen et al., *J. Med. Chem.* 39:4540, 1996. (b) PDB ID 1FIN, P.D. Jeffrey et al., *Nature* 376:313, 1995. (c) PDB ID 1JST, A.A. Russo et al., *Nature Struct. Biol.* 3:696, 1996.]

de ciclina, síntesis periódica de CDK y ciclinas, y la acción de proteínas inhibidoras específicas de las CDK. La activación y desactivación controladas de manera precisa en el tiempo de una serie de CDK produce señales que actúan como un reloj que orquesta los acontecimientos en la división celular normal asegurando que se ha completado una fase antes de comenzar la siguiente.

Regulación de las CDK por fosforilación La actividad de una CDK se ve afectada notablemente por la fosforilación y desfosforilación de dos residuos críticos de la proteína **(Fig. 12-34)**. La fosforilación de la Thr^{160} en la CDK2 estabiliza una conformación en la que el "bucle T" autoinhibidor se aleja de la hendidura de unión del sustrato de la quinasa, abriéndolo a la unión de proteínas sustrato. La desfosforilación de la Tyr^{15} de la CDK2; elimina una carga negativa que bloquea la entrada de ATP a su sitio de unión. Este mecanismo de activación de CDK se autorefuerza: el enzima (PTP) que desfosforila Ⓟ-Tyr^{15} es a la vez sustrato de la CDK que se activa por fosforilación. La combinación de estos factores activa la CDK de manera multiplicativa, haciendo que fosforile dianas proteicas situadas **más adelante en la ruta** que son vitales para el progreso del ciclocelular **(Fig. 12-35a)**.

La presencia de cortes de cadena sencilla del DNA llevan a la detención del ciclo celular en G2 mediante la activación de dos proteínas (ATM y ATR; véase la Fig. 12-37), Estas proteínas desencadenan una cascada de respuestas que incluyen la inactivación de la PTP que desfosforila la Tyr^{15} de la CDK. Con la CDK inactivada, la célula se detiene en G2 incapaz de dividirse hasta que se haya reparado el DNA y se inviertan los efectos de la cascada.

Degradación controlada de la ciclina - La degradación proteolítica de las ciclinas mitóticas, altamente específica y temporalmente precisa, regula la actividad CDK a lo largo del ciclo celular (Fig. 12-35b). El paso a través de la mitosis requiere primero la activación y luego la destrucción de las ciclinas A y B que activan la subunidad catalítica de la CDK de la fase M. Estas ciclinas contienen cerca del extremo amino terminal la secuencia –Arg-Thr-Ala-Leu-Gly-Asp-Ile-Gly-Asn–, el "recuadro de destrucción" que marca las proteínas para su degradación. (Esta utilización del término "recuadro" proviene de la práctica común, en los diagramas de secuencia de ácidos nucleicos o proteínas, de enmarcar dentro de un recuadro una secuencia corta de residuos nucleótidos o aminoácidos con una función especial. Ello no implica ninguna estructura tridimensional). La proteína, DBRP (*d*estruction *b*ox *r*ecognizing *p*rotein: proteína que reconoce el recuadro de destrucción), reconoce esta secuencia e inicia el proceso de degradación de la ciclina poniendo en contacto la ciclina con otra proteína, la **ubiquitina**. La ciclina y la ubiquitina

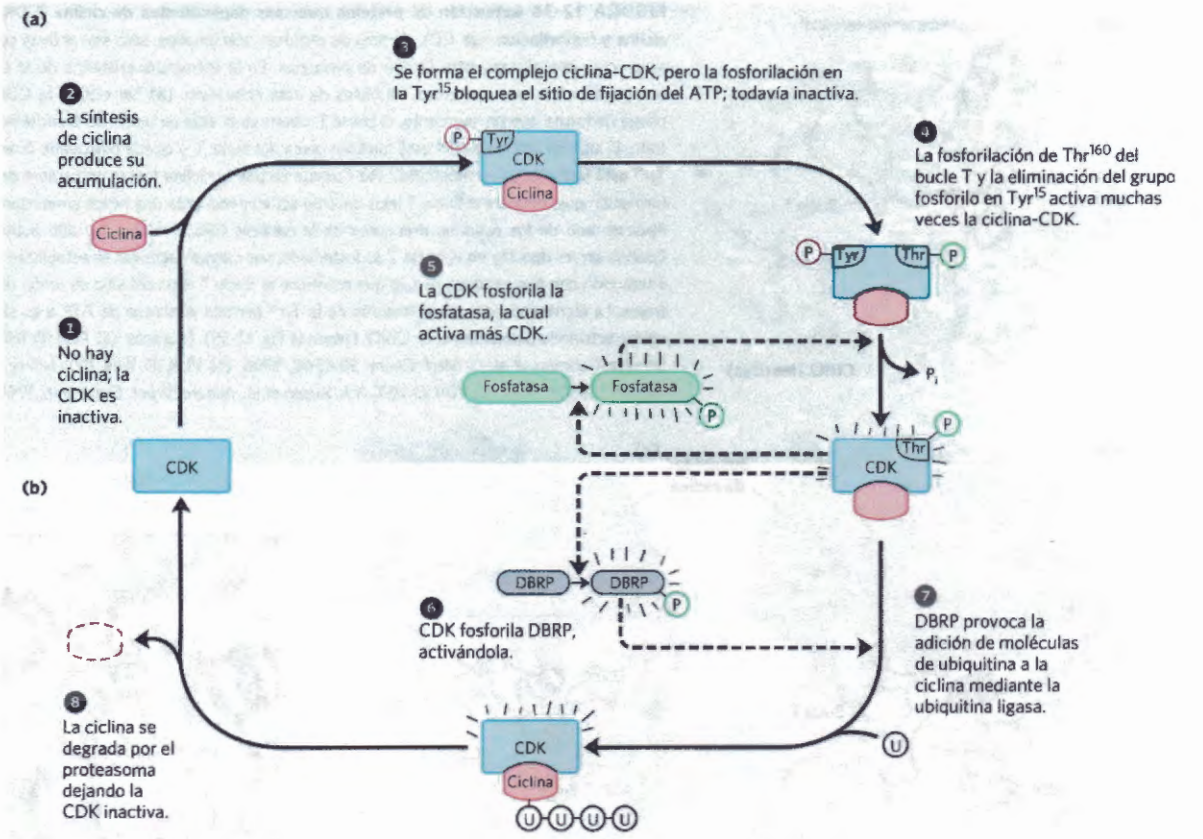


FIGURA 12-35 Regulación de CDK por fosforilación y proteólisis. (a) Cuando la célula entra en mitosis, la CDK de la fase M está inactiva (paso ❶). Al sintetizarse ciclina (paso ❷) se forma el complejo ciclina-CDK (paso ❸). El bucle T se coloca en el sitio de unión de sustrato de CDK, y la Ⓟ-Tyr^{15} bloquea su sitio de unión a ATP, manteniendo el complejo inactivo. Cuando se fosforila la Thr^{160} del bucle T, éste abandona el sitio de unión de sustrato, y cuando se desfosforila la Tyr^{15} el ATP es capaz de unirse. Estos dos cambios activan muchas veces la ciclina (paso ❹). Se obtiene activación adicional mediante la acción de CDK, que fosforila y activa el enzima que desfosforila Ⓟ-Tyr^{15} (paso ❺). **(b)** El complejo activo ciclina-CDK induce su propia inactivación mediante fosforilación de DBRP (*destruction box recognizing protein*, proteína de reconocimiento del recuadro de destrucción; paso ❻). A continuación DBRP y ubiquitina ligasa añaden moléculas de ubiquitina (U) a la ciclina (paso ❼), marcándola para su destrucción por el complejo de enzimas proteolíticos denominado proteasoma (paso ❽).

activada se unen covalentemente mediante el enzima ubiquitina ligasa. Varias moléculas más de ubiquitina, se unen entonces, proporcionando la señal para que un complejo enzimático proteolítico, el **proteasoma**, degrade la ciclina.

¿Cómo se controla el momento oportuno para la degradación de la ciclina? Se produce un bucle de retroalimentación en el proceso global que se muestra en la Figura 12-35. El aumento en la actividad de la CDK (paso ❹) conduce a la proteólisis final de la ciclina (paso ❽). La ciclina recién sintetizada se asocia con la CKD, activándola. La CDK activa fosforila y activa la DBRP. La DBRP activa provoca entonces las proteólisis de la ciclina. El descenso de la concentración de ciclina provoca una disminución en la actividad de la CDK, y la actividad de la DBRP también disminuye a través de una lenta pero constante desfosforilación e inactivación por una DBRP fosfatasa. El nivel de ciclina se recupera finalmente gracias a la síntesis de nuevas moléculas de ciclina.

El papel de la ubiquitina y de los proteasomas no se limita a la regulación de la ciclina; tal como veremos en el Capítulo 27, ambos actúan en el recambio de proteínas celulares, un proceso fundamental en el mantenimiento de las condiciones celulares adecuadas.

Factores de crecimiento estimulan la síntesis de CDK y ciclina El tercer mecanismo para cambiar la actividad CDK es la regulación de la velocidad de síntesis de ciclinas, de CDK, o de ambas. Señales extracelulares tales como **factores de crecimiento** y citoquinas (señales de desarrollo que inducen la división celular) activan, por fosforilación, los factores de transcripción nucleares Jun y Fos, que promueven la síntesis de muchos de productos génicos, entre los que se incluyen ciclinas, CDK y el factor de transcripción E2F. A su vez, E2F estimula la producción de varios enzimas esenciales para la síntesis de desoxinucleótidos y de DNA, y la CDK y la ciclina hacen que la célula entre en la fase S **(Fig. 12-36)**.

Inhibición de las CDK Finalmente, proteínas inhibidoras específicas se unen e inactivan CDK específicas. Una de estas proteínas es la p21, que se discutirá más adelante.

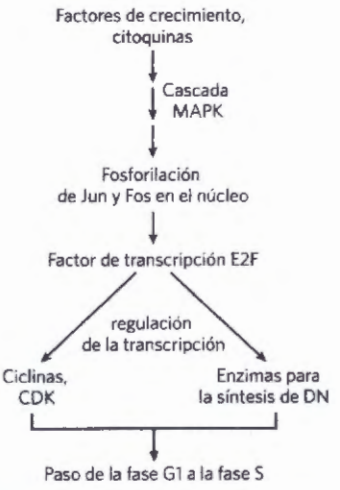


FIGURA 12-36 Regulación de la división celular por factores de crecimiento. La vía que va desde los factores de crecimiento hasta la división celular pasa a través de la cascada enzimática que activa MAPK; la fosforilación de los factores de transcripción nucleares Jun y Fos y la actividad del factor de transcripción E2F, que promueve la síntesis de varios enzimas esenciales para la síntesis de DNA.

Estos cuatro mecanismos de control modulan la actividad de CDK específicas que, a su vez, controlan si una célula se dividirá, se diferenciará, se convertirá en latente o empezará un nuevo ciclo de división después de un periodo de latencia. Los detalles de la regulación del ciclo celular, tales como el número de ciclinas y quinasas diferentes, y las combinaciones en las que actúan, difieren entre las diferentes especies, pero el mecanismo básico se ha conservado durante la evolución de todas las células eucarióticas.

Las CDK regulan la división celular por fosforilación de proteínas clave

Hemos examinado de qué modo la célula mantiene un control estricto de la actividad CDK, pero ¿cómo controla la actividad de la CDK el ciclo celular? La lista de proteínas diana sobre las que se sabe que actúan las CDK continúa creciendo y queda mucho por explicar. Pero podemos ver un patrón general en la regulación por CDK al inspeccionar el efecto de las CDK sobre las estructuras de la lamina y la miosina y sobre la actividad de la proteína del retinoblastoma.

La estructura de la envoltura nuclear se mantiene en parte gracias a la alta organización de redes de filamentos intermedios compuestos por la proteína **lamina**. La ruptura de la envoltura nuclear antes de la segregación de las cromátidas hermanas en la mitosis se debe, en parte, a la fosforilación de la lamina por una CDK, que provoca la despolimerización de los filamentos de lamina.

Una segunda diana de la quinasa es la maquinaria contráctil (actina y miosina) impulsada por ATP, que pinza una célula en división en dos partes iguales durante la citoquinesis. Después de la división, la CDK fosforila una pequeña subunidad reguladora de la miosina, lo que provoca la disociación de la miosina de los filamentos de actina e inactiva la maquinaria contráctil. Seguidamente la desfosforilación permite la reformación del aparato contráctil para la siguiente ronda de citoquinesis.

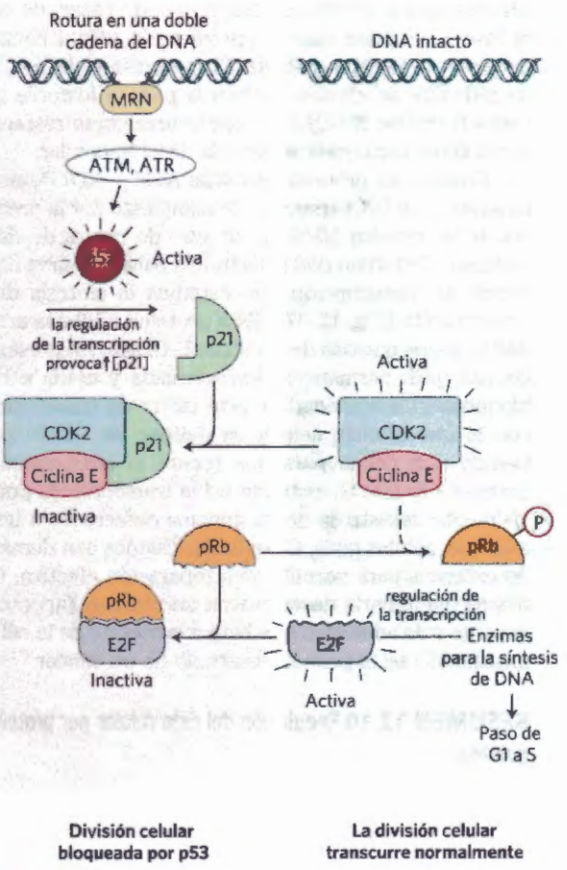


FIGURA 12-37 Regulación del paso de G1 a S por fosforilación de pRb. El factor de transcripción E2F promueve la transcripción de genes de ciertos enzimas esenciales en la síntesis de DNA. La proteína del retinoblastoma, pRb, puede unirse a E2F (parte inferior izquierda) inactivándolo e impidiendo la transcripción de estos genes. La fosforilación de pRb por CDK2 impide que se una a E2F para inactivarlo con lo que se transcriben los genes y se permite la división celular. La lesión del DNA celular (parte superior izquierda) provoca una serie de acontecimientos que inactivan CDK2 bloqueando la división celular. Cuando la proteína MRN detecta una lesión en el DNA, activa dos proteína quinasas, ATM y ATR, que fosforilan y activan el factor de transcripción p53. p53 promueve la síntesis de otra proteína, p21, que es un inhibidor de la CDK2. La inhibición de la CDK2 detiene la fosforilación de pRb que, por consiguiente, continúa unida a E2F inhibiéndolo. Con E2F inactivado no se transcriben los genes esenciales para la división celular con lo que ésta queda bloqueada. Cuando se ha reparado el DNA se libera la inhibición con lo que se divide la célula.

Un tercer y muy importante sustrato de la CDK es la **proteína del retinoblastoma, pRB**, que participa en el mecanismo que detiene la división celular en G1 si se detecta una lesión en el DNA **(Fig. 12-37)**. Llamada así por la línea celular de un tumor de retina en que fue descubierta, pRb funciona en la mayoría, quizá en todos, los tipos celulares regulando la división celular en respuesta a una serie de estímulos. La pRb no fosforilada se une al factor de transcripción E2F; mientras está unido a pRb, E2F no puede promover la transcripción de un grupo de genes necesarios para la síntesis del DNA (los genes de la DNA polimerasa α, la ribonucleótido reductasa, y otras proteínas; véase el Capítulo 25).

En este estado el ciclo celular no puede pasar de G1 a la fase S, el paso que compromete la célula hacia la mitosis y la división celular. El mecanismo de bloqueo de pRb-E2F se elimina cuando la pRb se fosforila gracias a la ciclina E-CDK2, lo que ocurre como respuesta a una señal para que continúe la división celular.

Cuando las proteína quinasas ATM y ATR detectan lesiones en el DNA (puestas de manifiesto por la presencia de la proteína MRN en un sitio de rotura de doble cadena), fosforilan p53 activándola para que sirva como factor de transcripción que estimula la síntesis de la proteína p21 (Fig. 12-37). Esta proteína inhibe la actividad proteína quinasa de la ciclina E-CDK2. En presencia de p21, pRb permanece desfosforilada y unida a E2F, bloqueando la actividad de este factor de transcripción con lo que el ciclo celular se detiene en G1. Esto da tiempo a la célula para que repare el DNA antes de entrar en la fase S, evitando así la transferencia potencialmente desastrosa de un genoma defectuoso a una o a las dos células hijas. Cuando las lesiones son demasiado extensas para permitir una reparación efectiva, esta misma maquinaria desencadena un proceso (apoptosis, descrito más adelante) que lleva a la muerte de la célula, impidiendo así el posible desarrollo de un cáncer.

RESUMEN 12.10 Regulación del ciclo celular por proteína quinasas

- El paso a través del ciclo celular se regula por las proteína quinasas dependientes de ciclina (CDK) que actúan en puntos específicos del ciclo fosforilando proteínas clave y modulando sus actividades. La subunidad catalítica de las CDK es inactiva a menos que esté asociada con la subunidad ciclina reguladora.
- La actividad del complejo ciclina –CDK cambia durante el ciclo celular a través de la síntesis diferencial de las CDK, la degradación específica de la ciclina, la fosforilación y desfosforilación de residuos críticos en las CDK y la unión de proteínas inhibidoras a complejos ciclina-CDK específicos.
- Entre las dianas fosforiladas por las ciclina-CDK se encuentran proteínas de la envoltura nuclear y proteínas requeridas para la citoquinesis y reparación del DNA.

12.11 Oncogenes, genes supresores de tumores y muerte celular programada

Los tumores y el cáncer son el resultado de una división celular incontrolada. Normalmente, la división celular está regulada por una familia de factores de crecimiento extracelulares, proteínas que provocan la división de las células latentes y, en algunos casos, su diferenciación. El resultado es un equilibrio preciso entre la formación de células nuevas y la destrucción celular. La regulación de la división celular asegura que las células de la piel sean reemplazadas cada pocas semanas y que los glóbulos blancos lo sean cada pocos días. Cuando se rompe este equilibrio debido a defectos en las proteínas reguladoras, el resultado es, a veces, la formación de un clon celular que se divide de forma repetida y sin regulación (un tumor) hasta que su presencia interfiere con la función de los tejidos normales: cáncer. La causa directa es, casi siempre, un defecto genético en una o más proteínas reguladoras de la división celular. En algunos casos, se hereda un gen defectuoso de uno de los progenitores; en otros casos la mutación se produce cuando un compuesto tóxico del ambiente (mutágeno o carcinógeno) o radiaciones de alta energía interaccionan con el DNA de una célula dañándola e introduciendo una mutación. En la mayoría de ocasiones hay tanto una contribución heredada como una contribución ambiental y, también en la mayoría de casos se requiere más de una mutación para que tenga lugar una división totalmente fuera de control y, por consiguiente, un cáncer declarado.

Los oncogenes son formas mutadas de genes de proteínas que regulan el ciclo celular

Los oncogenes son versiones mutadas de genes que codifican proteínas de señalización implicadas en la regulación del ciclo celular. Los oncogenes se descubrieron originalmente en virus causantes de tumores. Más tarde se vio que derivaban de genes presentes en las células huésped del animal, llamados **proto-oncogenes**, que codifican proteínas reguladoras del crecimiento. Durante una infección vírica, la secuencia de DNA de un proto-oncogén del huésped se copia a veces por el virus y se incorpora a su genoma donde prolifera con el virus. En ciclos de infección posteriores, el proto-oncogén puede convertirse en defectuoso por ruptura o mutación. Los virus, a diferencia de las células animales, no poseen mecanismos efectivos para corregir los errores producidos durante la replicación del DNA, por lo que acumulan mutaciones rápidamente. Cuando un virus portador de un oncogén infecta una nueva célula huésped, el DNA vírico (y el oncogén) pueden incorporarse en el DNA de la célula huésped en donde puede interferir con la regulación de la división celular en la célula huésped. En un mecanismo no vírico alternativo, una célula de un tejido expuesta a carcinógenos puede sufrir una lesión en el DNA que convierte en defectuosa una de sus proteínas reguladoras con el mismo efecto que el mecanismo oncogénico: regulación defectuosa de la división celular.

Las mutaciones que producen oncogenes son genéticamente dominantes; si uno cualquiera de los cromosomas de un par contiene un gen defectuoso, su producto génico envía la señal de "división" y se origina el tumor. El defecto oncogénico puede darse en cualquiera de las proteínas implicadas en la comunicación de la señal de "división". Entre los oncogenes descubiertos hasta el presente se encuentran los que codifican proteínas de secreción que actúan como moléculas de señalización, factores de crecimiento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G y proteína quinasas), y factores de transcripción nucleares que controlan la expresión de genes esenciales para la división celular (Jun, Fos).

Algunos oncogenes codifican receptores de superficie con sitios de unión de señal defectuosos o ausentes de forma que su actividad Tyr quinasa intrínseca está desregulada. Por ejemplo, la oncoproteína ErbB es esencialmente idéntica al receptor normal del factor de crecimiento epidérmico, excepto que ErbB carece del dominio amino-terminal que normalmente une EGF **(Fig.12-38)**, por lo que queda fijada en su conformación activada. Como resultado de ello, la proteína ErbB

envía la señal de "división" tanto si EGF está presente como si no lo está. Mutaciones en *erbB2*, el gen de un receptor Tyr quinasa relacionado con ErbB están comúnmente asociadas con cánceres del epitelio glandular en la mama, estómago y ovarios. (Para entender el uso de las abreviaturas con las que se denominan los genes y sus productos, véase el Capítulo 25).

El papel prominente que juegan las proteína quinasas en los procesos de señalización relacionados con la división celular tanto normal como anormal las ha convertido en diana prioritaria en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento del cáncer (Recuadro 12-4). Las formas mutantes de la proteína G Ras son comunes en células tumorales. El oncogén *ras* codifica una proteína con una unión normal a GTP pero sin actividad GTPasa. La proteína Ras mutante está siempre, por tanto, en su forma activada (GTP-unido), independientemente de las señales que llegan a través de los receptores normales. El resultado puede ser un crecimiento descontrolado. Las mutaciones en *ras* están asociadas con un 30% a un 50% de los carcinomas de pulmón y colon y con más de un 90% de los carcinomas pancreáticos. ■

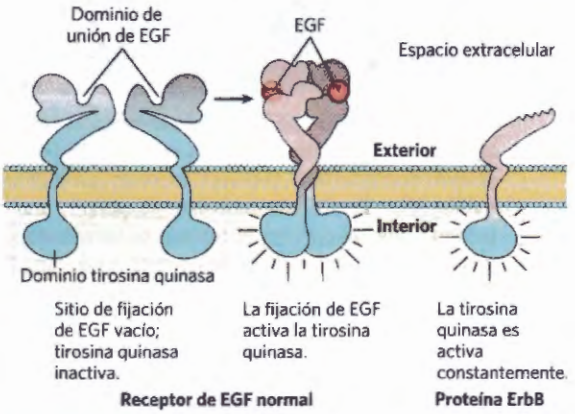


FIGURA 12-38 Receptor de EGF defectuoso codificado por un oncogén. El producto del oncogén *erbB* (la proteína ErbB) es una versión recortada del receptor normal del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Su dominio intracelular tiene la estructura normalmente inducida por la unión de EGF, pero la proteína carece del sitio de unión extracelular para EGF. Sin regulación por EGF, ErbB mantiene de forma constante la señal de división celular.

Defectos en ciertos genes eliminan las restricciones normales sobre la división celular

Los **genes supresores tumorales** codifican proteínas que normalmente reprimen la división celular. Mutaciones en uno o varios de estos genes pueden dar lugar a la formación de tumores. El crecimiento incontrolado provocado por genes supresores tumorales defectuosos es, a diferencia de los oncogenes, genéticamente recesivo; los tumores se forman sólo si *los dos* cromosomas de un par contienen un gen defectuoso. Esto es así porque la función de estos genes es impedir la división celular por lo que si una u otra copia del gen es normal, producirá la proteína normal y la inhibición normal de la división celular. En una persona que hereda una copia correcta y otra defectuosa cada célula del cuerpo de esta persona contendrá una copia defectuosa del gen. Si alguna de esas 10^{12} células somáticas experimenta una mutación en la copia buena, puede crecer un tumor a partir de esa célula doble mutante. Mutaciones en ambas copias de los genes pRb, p53 o p21, dan lugar a células en las que se han perdido las restricciones sobre la división celular con lo que se forma un tumor.

El retinoblastoma se observa en niños y produce ceguera si no se trata quirúrgicamente. Las células del retinoblastoma tienen dos versiones defectuosas del gen *Rb* (dos alelos defectuosos). Niños de muy corta edad que desarrollan retinoblastoma presentan comúnmente múltiples tumores en ambos ojos. Estos niños han heredado una copia defectuosa del gen *Rb* que está presente en todas las células; cada tumor es consecuencia de una única célula de la retina que ha sufrido una mutación en su copia buena del gen *Rb*. (Un feto con los dos alelos mutados en cada célula es inviable). Los pacientes de retinoblastoma que sobreviven a la infancia tienen también una alta incidencia de cánceres de pulmón, próstata o mama más adelante.

Un hecho mucho menos probable es que una persona que nazca con dos copias buenas del gen *Rb* sufra mutaciones independientes en ambas copias en la *misma* célula. Algunos individuos desarrollan retinoblastoma al final de la infancia, normalmente con un único tumor en un solo ojo. Estos individuos nacieron, presumiblemente, con dos copias buenas (alelos) de *Rb* en cada célula, pero han sufrido mutaciones en ambos alelos *Rb* en una misma célula de la retina, produciendo un tumor. Después de los tres años de edad, las células de la retina dejan de dividirse por lo que los retinoblastomas a edades más avanzadas son muy raros.

Los genes estabilizadores (también llamados genes vigilantes) codifican proteínas que funcionan en la reparación de defectos genéticos importantes debidos a replicación aberrante del DNA, radiación ionizante o carcinógenos ambientales. Las mutaciones en estos genes conducen a una frecuencia elevada de lesiones no reparadas (mutaciones) en otros genes, incluidos los proto-oncogenes y los genes supresores tumorales y, de este modo, al cáncer. Entre los genes estabilizadores se encuentran *ATM* (véase la Fig. 12-37); la familia génica *XP*, en la que las mutaciones producen xeroderma pigmentosum y los genes *BRCA1* asociados con algunos tipos de cáncer de mama (véase el Recuadro 25-1). Mutaciones en el gen de p53 también producen tumores; en más del 90% de los carcinomas cutáneos humanos de células escamosas (cánceres de piel) y en aproximadamente un 50% de todos los demás cánceres humanos, *p53* es defectuoso. Los raros individuos que *heredan* una copia defectuosa de *p53* normalmente presentan el síndrome canceroso de Li-Fraumeni, en el que se producen múltiples cánceres (de mama, cerebro, huesos, sangre, pulmón y piel) con una alta frecuencia y a una edad temprana. La explicación para estos tumores múltiples en este caso es igual que en el caso de las mutaciones de *Rb*: es probable que un individuo nacido con una copia defectuosa de *p53* en cada célula somática sufra una segunda mutación en *p53* en más de una célula durante su vida.

En resumen, pues, hay tres clases de defectos que pueden contribuir al desarrollo del cáncer: (1) oncogenes, en los que el defecto es el equivalente del pedal del

RECUADRO 12-4 MEDICINA Desarrollo de inhibidores de proteína quinasas para el tratamiento del cáncer (*continua*)

Cuando una célula se divide sin limitación reguladora alguna, da lugar, finalmente, a un clon de células tan grande que interfiere con las funciones fisiológicas normales (Fig. 1). En esto consiste el cáncer, una causa principal de muerte en el mundo desarrollado y cada vez con más incidencia en los países en desarrollo. En todos los tipos de cáncer la regulación normal de la división celular no es funcional debido a defectos en uno o más genes. Por ejemplo, los genes que codifican proteínas que normalmente envían señales intermitentes para la división celular se transforman en oncogenes, produciendo proteínas de señalización constitutivamente activas; o genes que codifican proteínas que normalmente restringen la división celular (genes supresores tumorales) y que mutan produciendo proteínas que carecen de esta función de frenado. En muchos tumores se dan los dos tipos de mutaciones.

Muchos oncogenes y genes supresores tumorales codifican proteína quinasas o proteínas que actúan en rutas con anterioridad a las proteína quinasas. Es, por tanto, razonable esperar que inhibidores específicos de proteína quinasas puedan ser valiosos en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, una forma mutante del receptor de EGF es un receptor Tyr quinasa (RTK) constantemente activo que señala división celular tanto si está presente el EGF como si no (véase la Fig. 12-38). En aproximadamente el 30% de todas las mujeres con cáncer de mama invasivo, una mutación en el gen receptor HER2/neu produce un RTK con actividad incrementada en hasta 100 veces. Otro RTK, el **receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR)**, ha de ser activado para la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para proveer a un tumor sólido su propio suministro de sangre con lo que la inhibición de VEGFR podría dejar al tumor sin los nutrientes esenciales. Las Tyr quinasas no receptores también pueden mutar con el resultado de una de una señalización constante y una división celular sin regular. Por ejemplo, el oncogén *Abl* (de *Ab*elson *l*eukemia virus) está asociado con la leucemia mieloide aguda, enfermedad sanguínea relativamente rara (~5.000 casos anuales en los Estados Unidos). Otro grupo de oncogenes codifican proteína quinasas dependientes de ciclina no reguladas. En cada uno de estos casos, inhibidores de proteína quinasas específicos podrían ser valiosos agentes quimioterápicos en el tratamiento de la enfermedad. No es sorprendente que se estén realizando grandes esfuerzos en el desarrollo de tales inhibidores. ¿Cómo se podría afrontar este reto?

Las proteína quinasas de todos los tipos muestran una sorprendente conservación de la estructura en el sitio activo. Todas ellas comparten con la estructura prototípica de la PKA las características que se muestran en la Figura 2: dos lóbulos que contienen el sitio activo, con un bucle P que ayuda a alinear y unir los grupos fosforilo del ATP, un bucle de activación que



FIGURA 1 División desregulada de una sola célula del colon llevó a un cáncer primario que hizo metástasis en el hígado. Los cánceres secundarios se ven como manchas blancas en este hígado obtenido en una autopsia. [Fuente: CNRI/Science Source.]

acelerador de un coche que queda bloqueado, con el motor en marcha a alta velocidad; (2) los genes supresores tumorales mutados en los que el defecto es equivalente a un fallo en los frenos; y (3) los genes estabilizadores mutados en los que el defecto conduce a la no reparación de un daño en la maquinaria de replicación celular, equivalente a la acción de un mecánico incompetente.

El efecto de las mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales no es de todo o nada. En algunos cánceres, quizás en todos, la progresión desde una célula normal a un tumor maligno requiere una acumulación de mutaciones (algunas veces durante varias décadas), ninguna de las cuales, por sí sola, es responsable del efecto final. Por ejemplo, el desarrollo del cáncer colorrectal tiene varias etapas reconocibles, cada una de ellas asociada a una mutación **(Fig. 12-39)**. Si una célula epitelial normal en el colon experimenta una mutación de las dos copias del gen supresor tumoral *APC* (*a*denomatous *p*olyposis *c*oli), empieza a dividirse más rápido de lo normal y produce un clon de sí mismo, un pólipo benigno (adenoma temprano). Por razones que aún no se conocen, las mutaciones de *APC* dan lugar a una inestabilidad cromosómica con lo que regiones enteras de un cromosoma se pierden o se reordenan durante la división celular. Esta inestabilidad puede dar lugar a otra mutación, normalmente en *ras*, que convierte el clon en un adenoma intermedio. Una tercera mutación (a menudo en el gen supresor tumoral *DCC*) conduce a un adenoma tardío. Sólo cuando las dos copias de *p53* se convierten en defectuosas esta masa celular se convierte en un carcinoma, un tumor maligno potencialmente mortal. La secuencia completa requiere, por lo tanto, al menos siete "golpes" genéticos: dos en cada uno de los tres genes supresores tumorales (*APC, DCC* y *p53*) y uno en el proto-oncogén *ras*. Hay probablemente varias rutas para el cáncer colorrectal,

se mueve para abrir el sitio activo al sustrato proteico y una hélice C que cambia de posición cuando se activa el enzima y lleva los residuos de la hendidura de fijación del sustrato a sus posiciones de unión.

Los inhibidores más sencillos de las proteína quinasas son análogos del ATP que ocupan el sitio de unión del ATP pero que no pueden actuar como dadores del grupo fosforilo. Se conocen muchos de estos compuestos, pero su utilidad clínica está limitada por su falta de selectividad: inhiben prácticamente todas las proteína quinasas con lo que se producirían efectos secundarios inaceptables. Se observa una mayor selectividad con compuestos que llenan parcialmente el sitio de unión de ATP pero que también interaccionan fuera de este sitio con partes de la proteína exclusivas de la proteína quinasa diana. Una tercera estrategia posible se basa en el hecho de que aunque la conformación activa de todas las proteína quinasas es similar, su conformación inactiva no lo es. Los medicamentos que se dirigen a la conformación inactiva de una proteína quinasa específica e impiden su conversión en la forma activa pueden tener una mayor especificidad de acción. Un cuarto enfoque emplea la gran especificidad de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que unen las porciones extracelulares de RTK específicos podrían eliminar la actividad quinasa del receptor al impedir la dimerización o al eliminarlo de la superficie celular. En algunos casos, un anticuerpo que se uniese de manera selectiva a la superficie de las células cancerosas podría hacer que el sistema inmune atacase dichas células.

La búsqueda de medicamentos activos contra proteína quinasas específicas ha proporcionado resultados esperanzadores. Por ejemplo, el mesilato de imatinib (Gleevec; Fig. 3a), una de las molécula pequeñas inhibidoras es casi 100% efectivo en conseguir la remisión en pacientes con leucemia mieloide crónica en sus primeras fases. El erlotinib (Tarceva; Fig. 3b), cuya diana es el EGFR, es efectivo contra el cáncer de pulmón no microcítico avanzado (NSCLC). Dado que en muchos sistemas de señalización de división celular intervienen más de una proteína quinasa, los inhibidores que actúan sobre varias proteína quinasas pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer.

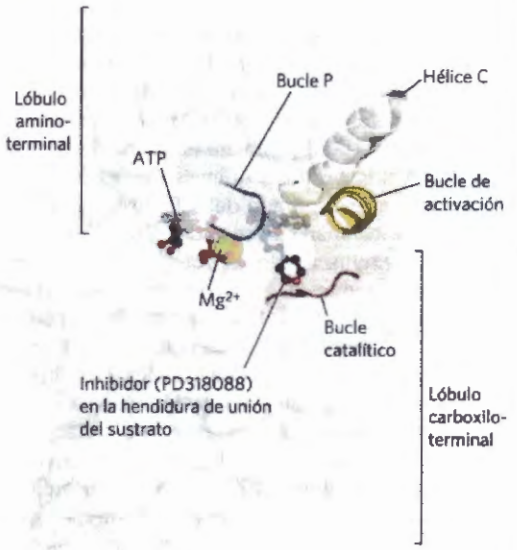


FIGURA 2 Características conservadas del sitio activo de las proteína quinasas. Los lóbulos amino- y carboxilo-terminales rodean el sitio activo del enzima, cerca del bucle catalítico y del sitio de unión de ATP. El bucle de activación de ésta y muchas otras quinasas experimenta fosforilación, a continuación se desplaza lejos del sitio activo para exponer la hendidura de unión del sustrato, que en esta imagen está ocupada por un inhibidor específico de este enzima, PD318088. El bucle P es esencial para la unión del ATP y la hélice C también ha de estar alineada correctamente para la unión del ATP y la actividad quinasa. [Fuente: PDB ID 1S91, J.F. Ohren et al., *Nature Struct. Mol Biol.* 11:1192, 2004.]

(Continua en la página siguiente)

pero es probable que continúe siendo válido el principio de que la malignidad completa sólo es el resultado de mutaciones múltiples. Al acumularse la mutaciones a lo largo del tiempo, las posibilidades de desarrollar un cáncer declarado aumentan con la edad (Fig. 12-39).

Cuando se detecta un pólipo en el estado de adenoma temprano y se eliminan quirúrgicamente las células que contienen las mutaciones iniciales, no se desarrollan los adenomas tardíos y los carcinomas; de ahí la importancia de una detección precoz. También las células y los organismos tienen sus sistemas de detección precoz. Por ejemplo, las proteínas ATM y ATR descritas en la Sección 12.10 pueden detectar lesiones demasiado importantes en el DNA para poderlas reparar de manera efectiva. Desencadenan entonces, a través de una ruta en la que interviene p53, el proceso de apoptosis en el que una célula que se ha convertido en peligrosa para el organismo se suicida.

El desarrollo de métodos de secuenciación rápidos y de bajo coste ha abierto una nueva ventana para conocer el proceso por el que se desarrolla un cáncer. En un estudio de cáncer en humanos, se determinaron las secuencias de todos los 20.000 genes en aproximadamente 3.300 tumores diferentes, y después se compararon con las secuencias génicas de tejidos no cancerosos procedentes en cada caso del mismo paciente. En total se detectaron casi 300.000 mutaciones. Tan sólo una pequeña parte de estas mutaciones, las **mutaciones conductoras**, eran la *causa* de la división celular no regulada; la gran mayoría (>99%) eran "mutaciones pasajeras" que ocurrían al azar y no conferían una ventaja selectiva para el crecimiento en el tejido en el que aparecían. Entre las mutaciones conductoras se hallaron aproximadamente 75 en genes supresores de tumores y 65 en oncogenes. Estas 140 mutaciones conductoras se encuadraban en tres categorías generales: las que afectan a la superviven-

RECUADRO 12-4 MEDICINA Desarrollo de inhibidores de proteína quinasas para el tratamiento del cáncer

El sunitinib (Sutent) y el sorafenib (Nexavar) tienen como diana varias proteína quinasas, entre ellas VEGFR y PDGFR. Estos dos fármacos se utilizan clínicamente en pacientes con tumores gastrointestinales y en carcinoma de célula renal avanzado, respectivamente. El trastuzumab (Herceptin), el cetuximab (Erbitux) y el bevacizumab (Avastin) son anticuerpos monoclonales cuyas dianas son HER2/neu, EGFR y VEGFR, respectivamente; los tres fármacos se utilizan clínicamente para ciertos tipos de cáncer. El conocimiento detallado de la estructura alrededor del sitio de unión del ATP posibilita el diseño de fármacos que inhiben una proteína quinasa *específica* al (1) bloquear el sitio de unión del ATP crítico, mientras que (2) interaccionan con residuos alrededor de este sitio que son exclusivos de la proteína quinasa concreta.

Hay al menos un centenar de compuestos en ensayos preclínicos. Entre los medicamentos que se están evaluando algunos se obtienen de fuentes naturales y algunos por síntesis química. El indirubin es un componente de una preparación china a base de hierbas utilizada tradicionalmente para tratar ciertas leucemias; inhibe CDK2 y CDK5. La roscovatina (Fig. 3d), una adenina sustituida, tiene un anillo bencilo que hace que sea un inhibidor muy específico de CDK2. Con varios centenares de fármacos anticáncer potenciales prontos a ser ensayados clínicamente, es realista esperar que algunos serán más efectivos o más específicos de la diana que los actualmente en uso.

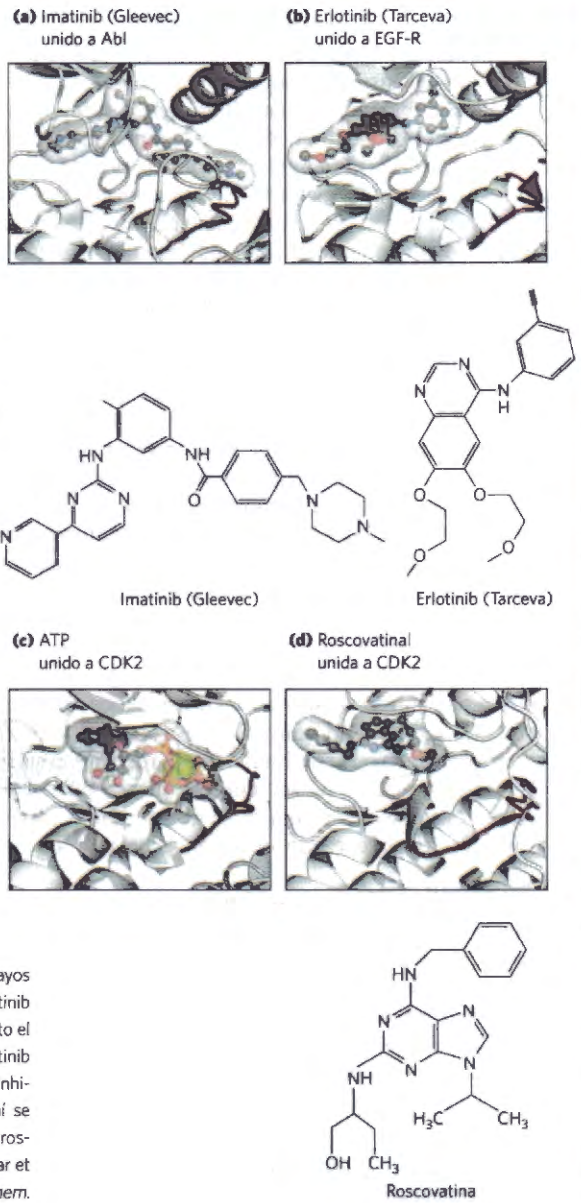


FIGURA 3 Algunos inhibidores de proteína quinasas actualmente en ensayos clínicos o en uso clínico, mostrando su unión a la proteína diana. **(a)** El imatinib se une al sitio activo de la quinasa del oncogén Abl (PDB ID 1IEP); ocupa tanto el sitio de unión del ATP como una región adyacente a dicho sitio. **(b)** El erlotinib se une al sitio activo de EGFR (PDB ID 1M17). **(c), (d)** La roscovatina es un inhibidor de las quinasa dependientes de ciclina CDK2, CDK7 y CDK9; aquí se muestran la unión normal de Mg^{2+}-ATP en el sitio activo (c) y la unión de la roscovatina (d) que impide la unión de ATP. . [Fuentes: (a) PDB ID 1IEP, B. Nagar et al., *Cancer Res.* 62:4236, 2002. (b) PDB ID 1M17, J. Stamos et al., *J. Biol. Chem.* 277:46, 2002. (c) PDB ID 1S91, J. F. Ohren et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:1192, 2004. (d) PDB ID 2A4L, w.f. De Azevedo et al., *Eur. J. Biochem.* 243:518, 1997.]

cia celular (en genes que codifican Ras, PI3K, MAPK, por ejemplo), las que afectan la capacidad de la célula para mantener el genoma intacto (ATM, ATR), y las que afectan el destino celular, haciendo que la célula se divida, se diferencie o se mantenga quiescente (APC es un ejemplo). Un número relativamente pequeño de mutaciones fueron muy comunes en múltiples tipos de cáncer, como por ejemplo en los genes Ras, p53 y pRb. ■

La apoptosis es el suicidio celular programado

Muchas células pueden controlar con precisión el tiempo de su propia muerte por el proceso de **muerte celular programada**, o **apoptosis** (del griego "decaer", como en las hojas que caen en el otoño). Un desencadenante de la apoptosis es el daño irreparable al DNA. La muerte celular programada también tiene lugar en el desarrollo de un embrión, cuando algunas células deben morir para proporcionar a un tejido u órgano su forma final. El retallado de los dedos a partir de yemas en los extremos del brazo implica una temporización precisa de la muerte de las células entre los huesos de los dedos en desarrollo. Durante el desarrollo del nematodo *C. elegans* a partir de un huevo fertilizado, exactamente 131 células (de un total de 1.090 células somáticas en el

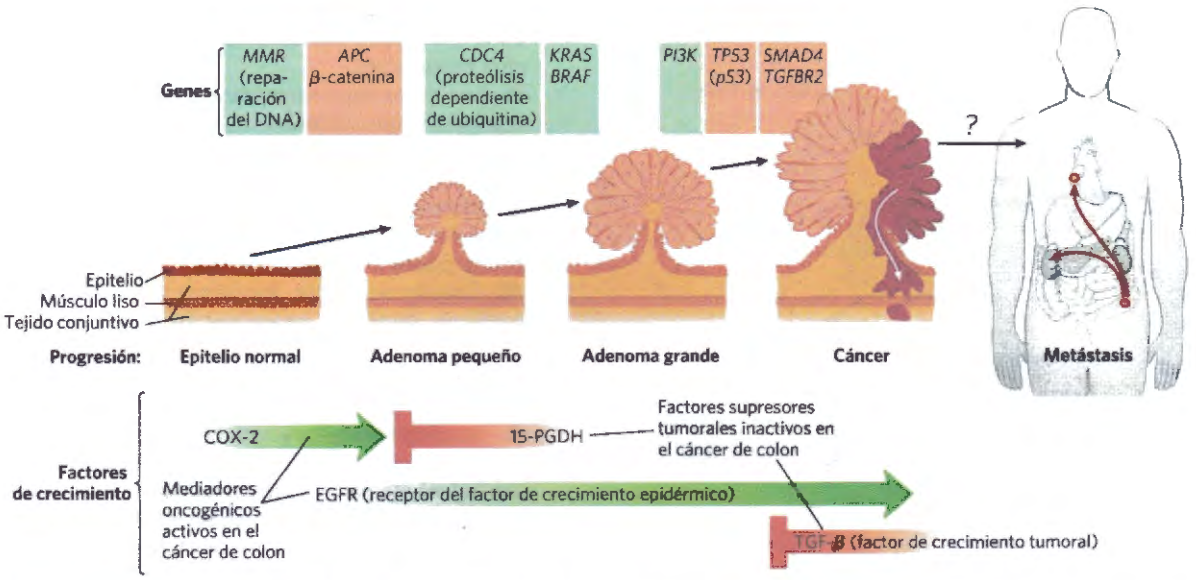


FIGURA 12-39 Transición en múltiples pasos desde una célula epitelial normal a un cáncer colorectal. Mutaciones seriadas en oncogenes (verde) o genes supresores tumorales (rojo) conducen de manera progresiva a un control menor de la división celular, hasta que finalmente se forma un tumor activo, que, a veces, puede experimentar metástasis (dispersión desde el sitio inicial a otras partes del cuerpo). La mutación del gen *MMR* lleva a una reparación defectuosa del DNA y, en consecuencia, a una velocidad de mutación superior. Mutaciones en ambas copias del gen supresor tumoral *APC* conducen a agrupamientos benignos de células epiteliales que se multiplican demasiado rápidamente (adenoma temprano). El oncogén CDC4 produce una ubiquitinación defectuosa, la cual es esencial para la regulación de las quinasas dependientes de ciclina (véase la Fig. 12-35). Los oncogenes KRAS y BRAF codifican las proteínas ras y raf (véase la Fig. 12-19) y esta disrupción adicional de la señalización conduce a la formación de un adenoma grande, que puede ser detectado por colonoscopia como un pólipo benigno. Mutaciones oncogénicas en el gen *PI3K* que codifica el enzima fosfoinositol-3 quinasa, o en *PTEN*, que regula la síntesis de este enzima, produce un refuerzo adicional de la señal: divide ahora. Cuando una célula de uno de los pólipos experimenta mutaciones adicionales en los genes supresores tumorales *DCC* y *p53* (véase la Fig. 12-37, por ejemplo, se forman tumores cada vez más agresivos. Finalmente, mutaciones en otros genes supresores tumorales tales como *SMAD4* originan un tumor maligno y, a veces, un tumor metastásico que puede extenderse a otros tejidos. Un segundo tipo de mutación que puede empeorar los efectos nocivos es el que afecta la producción o acción de factores de crecimiento o sus receptores (parte inferior). Mutaciones en EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) o TGF-β (factor de crecimiento transformador-β) favorecen el crecimiento incontrolado, al igual que mutaciones en los enzimas que producen ciertas prostaglandinas (COX-2; ciclooxigenasa; véase la Fig. 10-17) o el enzima 15-PGDH (15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa). La mayoría de los tumores malignos de otros tejidos son, probablemente, consecuencia de una serie de mutaciones como ésta, aunque no necesariamente de estos mismos genes o en este orden. [Fuente: Información de S.D. Markowitz y M.M. Bertagnolli, *N. Engl. J. Med.* 361:2449, 2009, Fig. 2.]

embrión) deben sufrir una muerte programada para poder construir el cuerpo adulto.

La apoptosis cumple también algunas misiones en otros procesos además del desarrollo. Cuando una célula productora de anticuerpos empieza a producir anticuerpos contra una proteína o glucoproteína presente en el cuerpo, esa célula experimenta una muerte programada en la glándula del timo, un mecanismo esencial para eliminar los anticuerpos contra uno mismo (la causa de muchas enfermedades autoinmunes). El desprendimiento mensual de células de la pared uterina (menstruación) es otro caso de muerte celular normal mediada por apoptosis. La caída de las hojas en otoño es el resultado de la apoptosis en células específicas del tallo. Algunas veces el suicidio celular no está programado sino que tiene lugar como respuesta a unas circunstancias biológicas que amenazan el resto del organismo. Por ejemplo, una célula infectada por un virus que muere antes de que se complete el ciclo infeccioso impide la propagación del virus a células vecinas. Varias situaciones de estrés severo tales como calor, hiperosmolaridad, luz UV, y radiación gamma también provocan el suicidio celular; seguramente el organismo se encuentra mejor si cualquier célula aberrante está muerta.

En los mecanismos de regulación que desencadenan la apoptosis intervienen algunas de las mismas proteínas que regulan el ciclo celular. La señal de suicidio a menudo proviene del exterior, a través de un receptor de la superficie. El factor de necrosis tumoral (TNF), producido por células del sistema inmunitario, interacciona con células a través de receptores específicos del TNF. Estos receptores tienen sitios de unión de TNF en la cara externa de la membrana plasmática y un "dominio de muerte" (~80 residuos aminoácidos) que pasa la señal de autodestrucción a través de la membrana a proteínas del citosol tales como TRADD (*T*NF *r*eceptor-*a*ssociated *d*eath *d*omain; dominio de muerte asociado al receptor de TNF) **(Fig. 12-40)**.

Cuando la caspasa 8, una caspasa "iniciadora", se activa por una señal apoptótica transportada a través de FADD, continúa su autoactivación mediante un corte de su propia forma proenzimática. La mitocondria es una de las dianas de la caspasa 8 activa. La proteasa produce la liberación de ciertas proteínas localizadas entre las membranas mitocondriales interna y externa: citocromo *c* y varias caspasas "efectoras" (véase la Fig. 19-39). El citocromo *c* se une a la forma proenzimática del enzima efector caspasa 9 y estimula su activación proteolíti-

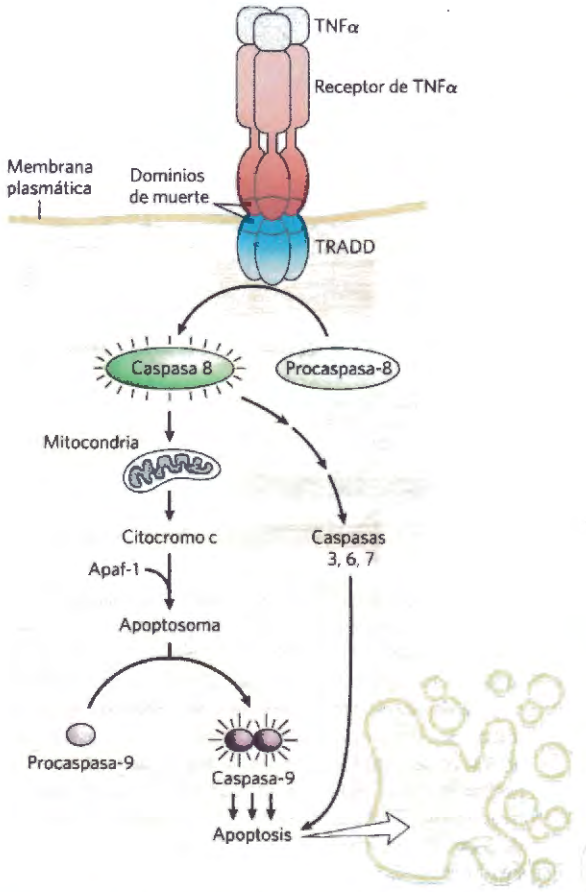


FIGURA 12-40 Acontecimientos iniciales de la apoptosis. Señales extracelulares iniciadoras de la apoptosis (TNFα) se une a su receptor específico en la membrana plasmática. El receptor ocupado interacciona con la proteína citosólica TRADD a través de "dominios de muerte" (dominios de 80 aminoácidos tanto en el receptor de TNFα como en TRADD), activando TRADD. La activación de TRADD inicia una cascada proteolítica que conduce a la apoptosis: TRADD activa la caspasa-8 que actúa liberando el citocromo c de la mitocondria, el cual, concertadamente con la proteína Apaf-1, activa la caspasa-9 y se desencadena la apoptosis (véase la Fig. 19-39).

ca. La caspasa 9 activada cataliza, a su vez, una gran destrucción de proteínas celulares, una causa principal de la muerte celular apoptótica. Una diana específica de la acción de las caspasas es una desoxirribonucleasa activada por caspasa.

En la apoptosis, los productos monoméricos de la degradación de proteínas y del DNA (aminoácidos y nucleótidos) se liberan en un proceso controlado que permite que sean captados y reutilizados por células vecinas. La apoptosis permite, así, que el organismo elimine una célula que ya no se necesita o que es potencialmente peligrosa sin desperdiciar sus componentes.

RESUMEN 12.11 Oncogenes, genes supresores tumorales y muerte celular programada

■ Los oncogenes codifican proteínas de señalización defectuosas. Al dar continuamente la señal de división celular provocan la formación de un tumor. Los oncogenes son genéticamente dominantes y pueden codificar factores de crecimiento, receptores, proteínas G, proteína quinasas, o reguladores nucleares de la transcripción defectuosos.

■ Los genes supresores tumorales codifican proteínas reguladoras que normalmente inhiben la división celular; las mutaciones en estos genes son genéticamente recesivas pero pueden desencadenar la formación de tumores.

■ El cáncer es generalmente el resultado de una acumulación de mutaciones en los oncogenes y en los genes supresores tumorales.

■ Cuando se mutan los genes estabilizadores, que codifican proteínas necesarias para la reparación de lesiones genéticas, otras mutaciones quedan sin reparar, entre ellas mutaciones en proto-oncogenes y en genes supresores tumorales, que pueden provocar el cáncer.

■ La apoptosis es la muerte celular programada y controlada que funciona durante el desarrollo normal y en la edad adulta para desprenderse de células no necesarias, dañadas o infectadas. La apoptosis puede ser desencadenada por señales extracelulares, tales como el TNF, a través de receptores de la membrana plasmática.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

transducción de señal 437
especificidad 437
cooperatividad 438
amplificación 438
cascada enzimática 438
modularidad 438
proteínas de armazón 438
desensibilización 438
integración 439
localización de respuesta 439
receptores acoplados a proteína G (GPCR) 440
proteínas de unión de nucleótidos de guanosina 440
proteínas G 440
segundo mensajero 440
agonista 441
antagonista 441
receptores β-adrenérgicos 441
receptores heptahelicoidales 441
proteína G estimuladora (G_s) 441
adenilil ciclasa 441
proteína quinasa dependiente de cAMP (proteína quinasa A; PKA) 441
bucle P 444
proteína activadora de la GTPasa (GAP) 443
regulador de la señalización por proteína G (RGS) 443
factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF) 443
secuencia consenso 445
β-arrestina (βarr; arrestina 2) 448
quinasas de receptor acoplado a proteína G (GRK) 449
proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) 449
proteína G inhibidora (G_i) 449
proteínas adaptadoras 450
AKAP (proteínas de anclaje a la quinasa A) 450
fosfolipasa C (PLC) 450
Inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP_3) 450
proteína quinasa C (PKC) 451
proteína fluorescente verde (GFP) 452
transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) 452
calmodulina (CaM) 451
proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}/calmodulina (CaM quinasas) 452
rodopsina 456
opsina 456
rodopsina quinasa 457
potencial de receptor 458
gustducina 458

Problemas

receptor Tyr quinasa (RTK) 460
autofosforilación 461
dominio SH2 461
Ras 462
proteínas G pequeñas 462
MAPK 463
guanosina 3',5'monofosfato cíclico (GMP cíclico; cGMP) 465
proteína quinasa dependiente de cGMP (proteína quinasa G; PKG) 466
factor natriurético auricular (ANF) 466
NO sintasa 466
dominios PTB 467
canales iónicos regulados por voltaje 471
ionotrópico 472
metabotrópico 472
elemento de respuesta a hormonas (HRE) 473
sistemas de señalización de dos componentes 474
receptor histidina quinasa 474
regulador de respuesta 474
ciclina 476
proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK) 476
ubiquitina 477
proteasoma 478
factores de crecimiento 478
proteína del retinoblastoma (pRb) 479
oncogén 480
proto-oncogén 480
gen supresor tumoral 481
muerte celular programada 484
apoptosis 484

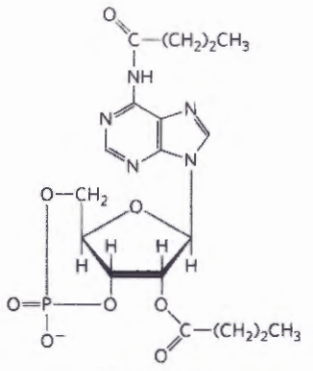
1. Experimentos hormonales en sistemas acelulares En la década de 1950, Earl W. Sutherland, Jr., y sus colegas llevaron a cabo experimentos pioneros para descubrir el mecanismo de acción de la adrenalina y el glucagón. A partir de lo que ha aprendido sobre la acción hormonal en este capítulo, interprete cada uno de los experimentos descritos a continuación. Identifique la sustancia X e indique el significado de los resultados.

(a) La adición de adrenalina a un homogenado de hígado normal provocó un incremento en la actividad de la glucógeno fosforilasa. Sin embargo, si el homogenado se centrifuga primero a alta velocidad y se añade adrenalina o glucagón a la fracción clara del sobrenadante que contiene fosforilasa, no se observa ningún incremento en la actividad fosforilasa.

(b) Cuando la fracción particulada de la centrifugación en (a) se trató con adrenalina, se produjo la sustancia X. La sustancia se aisló y purificó. A diferencia de la adrenalina, la sustancia X activaba la glucógeno fosforilasa al añadirla a la fracción del sobrenadante claro del homogenado de la centrifugación.

(c) La sustancia X era termoestable; es decir, que el tratamiento con calor no afectó su capacidad para activar la fosforilasa. (Pista: ¿Sería éste el caso si la sustancia X fuera una proteína?) La sustancia X era casi idéntica a un compuesto obtenido cuando se trató ATP puro con hidróxido de bario. (La Figura 8-6 le será de utilidad).

2. Efecto del dibutiril cAMP frente al cAMP en células intactas Los efectos fisiológicos de la adrenalina deberían en principio ser imitados al adicionar cAMP a las células diana. En la práctica, la adición de cAMP a células diana intactas sólo produce una mínima respuesta fisiológica. ¿Por qué? Cuando se añade el derivado dibutiril cAMP (mostrado abajo) relacionado estructuralmente, a células intactas, la respuesta fisiológica esperada aparece en seguida. Explique la base de la diferencia en la respuesta celular a estas dos sustancias. El dibutiril cAMP es ampliamente usado en estudios de función del cAMP.



Dibutiril cAMP
(N^6, O^2 Dibutiril adenosina 3',5'-monofosfato cíclico)

3. Efecto de la toxina del cólera sobre la adenilil ciclasa La bacteria gram-negativa *Vibrio cholerae* produce una proteína, la toxina del cólera (M_r 90.000), que es la responsable de los síntomas característicos del cólera: pérdida masiva del agua corporal y Na^+ a través de una diarrea continua y debilitante. Si los fluidos corporales y el Na^+ no son repuestos, aparece una deshidratación severa; si no se trata, la enfermedad es a menudo fatal. Cuando la toxina del cólera accede al tracto intestinal humano se une fuertemente a sitios específicos en la membrana plasmática de las células epiteliales que recubren el intestino delgado, haciendo que la adenilil ciclasa experimente una activación prolongada (horas o días).

(a) ¿Cuál es el efecto de la toxina del cólera sobre la [cAMP] en las células intestinales?

(b) Basándose en la información anterior, sugiera cómo funciona normalmente el cAMP en las células epiteliales intestinales.

(c) Sugiera un posible tratamiento para el cólera.

4. Mutaciones en la PKA Explique cómo las mutaciones en la subunidad R o C de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) pueden llevar a (a) una PKA activa constantemente o (b) a una PKA inactiva constantemente.

5. Efectos terapéuticos del albuterol Los síntomas respiratorios del asma se deben a la constricción de los bronquios y bronquiolos de los pulmones debido a la contracción del músculo liso de sus paredes. Esta constricción se puede invertir incrementando la [cAMP] en el músculo liso. Explique los efectos terapéuticos del albuterol, un agonista β-adrenérgico que se toma para el asma (por inhalación). ¿Esperaría que este medicamento tuviera algún efecto secundario? ¿Cómo se podría diseñar un fármaco que no tuviera estos efectos?

6. Terminación de señales hormonales Las señales transportadas por hormonas finalmente deben ser terminadas. Describa varios mecanismos diferentes para la terminación de señales

7. Utilización de FRET para explorar las interacciones proteína-proteína in vivo. La Figura 12-8 muestra la interacción entre la β-arrestina y el receptor β-adrenérgico. ¿De qué modo usaría la FRET (véase el Recuadro 12-2) para demostrar esta interacción en células vivas? ¿Qué proteínas fusionaría? ¿Qué longitud de onda utilizaría para iluminar las células y cuál utilizaría para el seguimiento? ¿Qué esperaría observar en caso de que hubiese interacción? ¿Y si no tuviese

lugar? ¿Cómo podría explicar el fracaso de este método para demostrar esta interacción?

8. Inyección de EGTA El EGTA (ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetraacético) es un agente quelante con un elevada afinidad y especificidad para Ca^{2+}. Al microinyectar una célula con la solución de Ca^{2+}-EGTA apropiada, se puede evitar que la $[Ca^{2+}]$ citosólica aumente por encima de 10^{-7}M. ¿Cómo podría una microinyección de EGTA afectar la respuesta celular a la vasopresina (véase la Tabla 12-4)? ¿Y al glucagón?

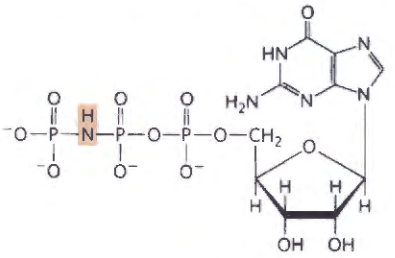
9. Amplificación de señales hormonales Describa todas las fuentes de amplificación en el sistema receptor de insulina.

10. Mutaciones en *ras* ¿De qué modo una mutación en *ras* que lleva a una proteína Ras sin actividad GTPasa afecta a la respuesta de una célula a la insulina?

11. Diferencias entre proteínas G Compare las proteínas G del tipo G_s, que actúan en la transducción de señal de receptores β-adrenérgicos, y Ras. ¿Qué propiedades comparten? ¿En qué difieren? ¿Cuál es la diferencia funcional entre G_s y G_i?

12. Mecanismos para la regulación de proteínas quinasas Identifique ocho tipos generales de proteína quinasas que se encuentran en células eucarióticas, y explique qué factor es *directamente* responsable de la activación de cada tipo.

13. Análogos de GTP no hidrolizables Muchos enzimas pueden hidrolizar GTP entre los fosfatos β y γ. El análogo del GTP β, γ-imidoguanosina 5'-trifosfato Gpp(NH)p, mostrado abajo, no puede ser hidrolizado entre los fosfatos β y γ.



Gpp(NH)p
(β,γ-Imidoguanosina 5'-trifosfato)

Prediga el efecto de la microinyección de Gpp(NH)p en un miocito sobre la respuesta celular a una estimulación β-adrenérgica.

14. Utilización de la unión de una toxina para la purificación de una proteína de canal La α-bungarotoxina es una potente neurotoxina que se encuentra en el veneno de una serpiente (*Bungarus multicinctus*). Se une con elevada especificidad a la proteína del receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) e impide que se abra el canal iónico. Se utilizó esta interacción para purificar AChR del órgano eléctrico del pez torpedo.

(a) Diseñe una estrategia para utilizar la α-bungarotoxina unida covalentemente a perlas cromatográficas para purificar la proteína de AChR (Sugerencia: Vea la Fig. 3-17c).

(b) Diseñe una estrategia para el uso de [^{125}I] α-bungarotoxina para purificar la proteína AChR.

15. Excitación desencadenada por hiperpolarización En muchas neuronas, la *despolarización* de la membrana lleva a la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje, a la generación de un potencial de acción y, en último término, a un flujo de Ca^{2+} hacia el interior que provoca la liberación de neurotransmisor en el extremo del axón. Idee una estrategia celular por la que la *hiperpolarización* en los bastones pudiera producir excitación de la vía visual y el paso de señales visuales al cerebro. (Pista: La vía de señalización neuronal en organismos superiores consiste en una *serie* de neuronas que retransmiten información al cerebro. La señal liberada por una neurona puede ser excitadora o inhibidora para la siguiente neurona pos-sináptica).

16. Desensibilización visual La enfermedad de Oguchi es una forma hereditaria de ceguera nocturna. Los individuos afectados recuperan la visión lentamente después de un destello de luz brillante sobre un fondo oscuro, tal como las luces de un coche en una autopista. Sugiera qué defecto(s) molecular(es) puede(n) ser la causa de la enfermedad de Oguchi. Explique en términos moleculares por qué este defecto produce ceguera nocturna.

17. Efecto de un análogo permeable del cGMP sobre los bastones El 8-Br-cGMP, un análogo del cGMP, es permeable a las membranas celulares, sólo se degrada lentamente por la actividad PDE de los bastones y es tan efectivo como el cGMP en la apertura del canal regulado del segmento externo de la célula. Si se suspenden bastones en un tampón que contiene una [8-Br-cGMP] relativamente elevada y a continuación se iluminan las células mientras se mide el potencial de membrana, ¿qué observará?

18. Sensaciones gustativas caliente y fría Las sensaciones de calor y frío se transducen por un grupo de canales catiónicos regulados por la temperatura. Por ejemplo, TRPV1, TRPV3 y TRPM8 están normalmente cerrados, pero se abren en las condiciones siguientes: TRPV1 a ≥43 °C; TRPV3 a ≥33 °C y TRPM8 a <25 °C. Estos canales se expresan en neuronas sensoriales que se sabe que son responsables de la sensación de temperatura.

(a) Proponga un modelo razonable para explicar de qué modo la exposición de una neurona sensorial que contenga TRPV1 a temperaturas elevadas produce una sensación de calor.

(b) La capsaicina, uno de los ingredientes activos de la pimienta "picante", es un agonista de TRPV1. La capsaicina muestra una activación del 50% en la respuesta de TRPV1 a una concentración (es decir, tiene una EC_{50}) de 32 nM. Explique por qué incluso muy pocas gotas de salsa de pimienta picante puede saber muy "caliente" sin que le queme realmente.

(c) El mentol, uno de los componentes activos de la menta, es un agonista de TRPM8 (EC_{50} 30 *mM*) y de TRPV3 (EC_{50} = 20mM). ¿Qué sensación esperaría del contacto con bajas concentraciones de mentol? ¿Y con altas concentraciones?

19. Oncogenes, genes supresores tumorales y tumores Proporcione una explicación plausible sobre cómo podrían llevar a una división celular sin restricciones, cada una de las situaciones siguientes.

Las células del cáncer de colon contienen a menudo mutaciones en el gen que codifica el receptor de la prostaglandina E_2. La PGE_2 es un factor de crecimiento necesario para la división de las células del tracto gastrointestinal.

El sarcoma de Kaposi, un tumor frecuente en las personas con SIDA sin tratar, está producido por un virus portador de un gen de una proteína similar a los receptores de quimioquinas CXCR1 y CXCR2. Las quimioquinas son factores de crecimiento con especificidad de célula.

El adenovirus, un virus tumoral, es portador de un gen de la proteína E1A que se une a la proteína del retinoblastoma, pRb. (Pista: Vea la Fig. 12-49).

Una característica importante de muchos oncogenes y de genes supresores tumorales es su especificidad por el tipo celular. Por ejemplo, no se encuentran mutaciones en el receptor de PGE_2 en los tumores pulmonares. Explique esta observación. (Tenga en cuenta que la PGE_2 actúa a través de un GPCR en la membrana plasmática).

20. Mutaciones en genes supresores tumorales y oncogenes Explique por qué las mutaciones en genes supresores tumorales son recesivas (las dos copias del gen han de ser defectuosas para que la regulación de la división celular sea defectuosa) mientras que las mutaciones en oncogenes son dominantes.

21. Retinoblastoma en niños Explique por qué algunos niños con retinoblastoma desarrollan múltiples tumores de retina en ambos ojos, mientras que otros tienen un único tumor en un solo ojo.

22. Especificidad de una señal para un único tipo celular Discuta la validez de la siguiente proposición. Una molécula de señalización (hormona, factor de crecimiento o neurotransmisor) obtiene respuestas idénticas en diferentes tipos de células diana si contienen receptores idénticos.

Problema de análisis de datos

23. Exploración de la sensación de gusto en ratones Los sabores agradables constituyen una adaptación evolutiva para animar a los animales a consumir alimentos nutritivos. Zhao y colaboradores (2003) examinaron las dos principales sensaciones agradables del gusto: dulce y umami. El umami es un "gusto sabroso no salado único" provocado por aminoácidos, especialmente aspartato y glutamato que, probablemente, anima a los animales a consumir alimentos ricos en proteína. El glutamato monosódico (MSG) es un potenciador del sabor que explota esta sensibilidad.

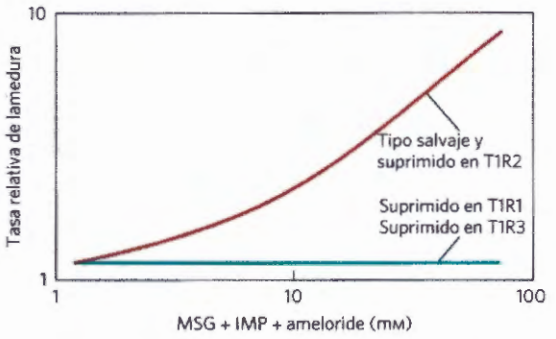
En el momento en que se publicó el artículo, se habían caracterizado de manera tentativa las proteínas receptoras específicas del gusto (marcadas SR en la Fig. 12-42) dulce y umami. Se conocían tres de estas proteínas (T1R1, T1R2 y T1R3) que funcionan en forma de complejos receptores heterodiméricos: T1R1-T1R3 se identificó de manera tentativa como el receptor del umami y T1R2-T1R3 como el receptor del dulce. No estaba claro de qué manera se codificaba la sensación del gusto y se enviaba al cerebro habiéndose propuesto dos modelos posibles. En el modelo basado en la célula, células sensoras del gusto individuales expresan sólo una clase de receptor; es decir, hay "células dulces", "células amargas", "células umami", etc. de modo que cada tipo de células envía su información al cerebro a través de nervios diferentes. El cerebro "conoce" qué gusto se ha detectado por la identidad de la fibra nerviosa que transmite el mensaje. En el modelo basado en el receptor, las células sensoras del gusto individuales tienen diversas clases de receptores que envían mensajes diferentes a lo largo de la misma fibra nerviosa al cerebro, dependiendo el mensaje según sea el receptor activado. En aquel momento tampoco estaba claro si había alguna interacción entre las diferentes sensaciones del gusto o si se necesitaban partes de un sistema sensor de sabor para otras sensaciones de sabor.

(a) Trabajos previos habían demostrado que diferentes proteínas de los receptores del gusto se expresan en conjuntos no solapantes de células receptoras del gusto. ¿Qué modelo apoya este hecho? Explique su razonamiento.

Zhao y colaboradores construyeron un conjunto de "ratones suprimidos" (knockout) (ratones homozigotos para alelos con pérdida de función de una de las tres proteínas receptoras, T1R1, T1R2 o T1R3) y ratones con doble supresión con T1R2 y T1R3 no funcionales. Se midió la percepción del gusto de estos ratones midiendo la "tasa de lamedura" de soluciones que contenían diferentes moléculas saborizantes. Los ratones lamen el pitorro de un biberón que contiene una solución con un sabor agradable más a menudo que una con una solución de gusto desagradable. Se midieron las tasas relativas de lamedura: con qué frecuencia los ratones lamían una solución de muestra en comparación con agua. Una tasa de lamedura relativa de 1 indicaba falta de preferencia; <1 aversión; >1 preferencia.

(b) Los cuatro tipos de cepas suprimidas tenían las mismas respuestas a los gustos salado y amargo que las cepas silvestres. ¿Cuál de las cuestiones anteriores pretendía resolver este experimento? ¿Qué concluye de los resultados?

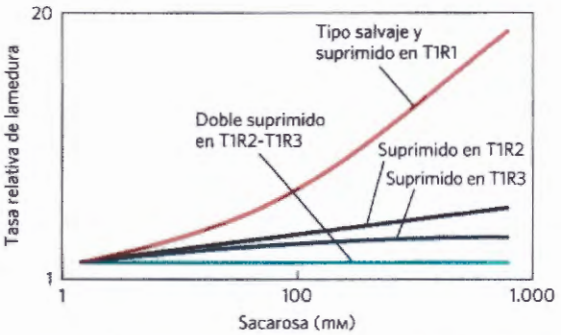
Se estudió a continuación la recepción del gusto umami midiendo las tasas relativas de lamedura por parte de las diferentes cepas de ratones con diferentes cantidades de MSG en la solución nutritiva. Observe que las soluciones también contenían inosina monofosfato (IMP) que es un fuerte potenciador de la recepción del gusto umami (y un ingrediente común de las sopas ramen (con fideos), junto con el MSG) y ameloride, que suprime el gusto salado agradable impartido por el sodio del MSG. Los resultados se muestran en la gráfica.



(c) ¿Son consistentes estos datos con que el receptor del gusto umami consiste en un heterodímero de T1R1 y T1R3? ¿Por qué sí o por qué no?

(d) ¿Qué modelo o modelos de codificación de gusto apoya este resultado? Explique su razonamiento.

Zhao y colaboradores llevaron a cabo seguidamente una serie de experimentos similares utilizando sacarosa como sabor dulce. Estos resultados se muestran a continuación.



(e) ¿Son estos datos consistentes con que el receptor del sabor dulce consiste en un heterodímero de T1R2 y T1R3? ¿Por qué sí o por qué no?

(f) Hubo algunas respuestas inesperadas a concentraciones muy elevadas de sacarosa. ¿De qué modo complican la idea de un sistema heterodimérico tal como se ha presentado anteriormente?

Además de azúcares, los humanos también apreciamos como dulces otros compuestos (por ej., los péptidos monelina y aspartamo); los ratones no les encuentran sabor dulce. Zhao y colaboradores insertaron en los ratones suprimidos en T1R2 una copia del gen humano T1R2 bajo control del gen promotor de T1R2 del ratón. Estos ratones modificados ahora reconocían el sabor dulce de la monelina y de la sacarina. A continuación añadieron a los ratones suprimidos en R1T1 la proteína RASSL, un receptor unido a una proteína G del opiáceo sintético espiradolina; el gen de RASSL estaba bajo control de un promotor que podía ser inducido alimentando los ratones con tetraciclina. Estos ratones no preferían la espiradolina en ausencia de tetraciclina; en presencia de tetraciclina mostraron una fuerte preferencia por la espiradolina a concentraciones nanomolares.

(g) ¿De qué modo refuerzan estos experimentos las conclusiones de Zhao y colaboradores acerca del mecanismo de la sensación del gusto?

Referencia

Zhao, G.Q., Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N.J.P. Ryba, and C. Zuker. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255–266.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

PARTE II

BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO

13 Bioenergética y tipos de reacción bioquímicos 495

14 Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato 533

15 Principios de regulación metabólica 573

16 El ciclo del ácido cítrico 617

17 Catabolismo de los ácidos grasos 647

18 Oxidación de los aminoácidos y producción de urea 673

19 Fosforilación oxidativa 707

20 Fotosíntesis y síntesis de glúcidos en plantas 751

21 Biosíntesis de los lípidos 805

22 Biosíntesis de los aminoácidos, nucleótidos, y moléculas relacionadas 853

23 Regulación hormonal e integración del metabolismo en los mamíferos 899

El metabolismo es una actividad celular muy coordinada en la que muchos sistemas multienzimáticos (rutas metabólicas) cooperan para (1) obtener energía química a partir de la captura de energía solar o degradando nutrientes ricos en energía obtenidos del ambiente; (2) convertir moléculas nutrientes en las moléculas características de la propia célula, incluidos los precursores de macromoléculas; (3) polimerizar los precursores monoméricos en macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, y polisacáridos; y (4) sintetizar y degradar biomoléculas requeridas en funciones celulares especializadas, tales como los lípidos de membrana, mensajeros intracelulares y pigmentos.

Aunque el metabolismo abarca cientos de reacciones diferentes catalizadas por enzimas, las rutas metabólicas centrales, nuestro foco de atención principal en la Parte II, son pocas y son, además, notablemente similares en todas las formas de vida. Los organismos vivos se pueden dividir en dos grandes grupos según la forma química a través de la que obtienen carbono del medio. Los **autótrofos** (tales como las bacterias fotosintéticas, las algas verdes y las plantas superiores) pueden utilizar dióxido de carbono de la atmósfera como única fuente de carbono a partir de la cual construyen todas sus biomoléculas carbonadas (véase la Fig. 1-5). Los **heterótrofos** no pueden utilizar el dióxido de carbono atmosférico por lo que han de obtener carbono del ambiente en forma de moléculas orgánicas relativamente complejas tales como la glucosa. Los animales multicelulares y la mayoría de microorganismos son heterotróficos. Las células y organismos autotróficos son relativamente autosuficientes, mientras que las células y organismos heterotróficos, con su necesidad de carbono en formas más complejas, han de subsistir a partir de los productos de otros organismos.

Muchos organismos autotróficos son fotosintéticos y obtienen su energía a partir de la luz solar mientras que los organismos heterotróficos obtienen su energía de la degradación de nutrientes orgánicos producidos por los autótrofos. En nuestra biosfera, los autótrofos y los heterótrofos viven conjuntamente en un gran ciclo interdependiente en el que los organismos autotróficos utilizan el dióxido de carbono atmosférico para construir sus biomoléculas orgánicas, generando algunos de ellos en el proceso oxígeno a partir de agua. Los heterótrofos, a su vez, utilizan los productos orgánicos de los autótrofos como nutrientes y devuelven dióxido de carbono a la atmósfera. Algunas de las reacciones de oxidación que producen dióxido de carbono también consumen oxígeno, convirtiéndolo en agua. De este

modo carbono, oxígeno y agua se ciclan constantemente entre los mundos heterotrófico y autotrófico, con la energía solar como fuerza motriz de este proceso global **(Fig. 1)**.

Todos los organismos vivos necesitan también una fuente de nitrógeno, necesaria para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos. Las bacterias y las plantas pueden, generalmente, utilizar amoníaco o nitratos como única fuente de nitrógeno, pero los animales vertebrados deben obtener nitrógeno en forma de aminoácidos u otros compuestos orgánicos. Sólo unos cuantos organismos, las cianobacterias y muchas especies de bacterias del suelo que viven simbióticamente en las raíces de algunas plantas, son capaces de convertir ("fijar") nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco. Otras bacterias (las bacterias nitrificantes) oxidan el amoníaco a nitritos y nitratos, y otras convierten el nitrato en N_2. Las bacterias anamox convierten amoníaco y nitrito en N_2. Así, además de los ciclos globales del carbono y del oxígeno, en la biosfera opera un ciclo del nitrógeno en el que se transforman enormes cantidades de nitrógeno **(Fig. 2)**. El ciclado del carbono, oxígeno y nitrógeno, en el que intervienen en último término todas las especies, depende de un equilibrio adecuado entre las actividades de los productores (autótrofos) y los consumidores (heterótrofos) en nuestra biosfera.

Estos ciclos de materia son impulsados por un enorme flujo de energía hacia y a través de la biosfera, que empieza con la captura de la energía solar por los organismos fotosintéticos y la utilización de esta energía para generar glúcidos y otros nutrientes orgánicos ricos en energía; estos nutrientes se utilizan a su vez como fuentes de energía por los organismos heterotróficos. En los procesos metabólicos, y en todas las transformaciones de energía, se produce una pérdida de energía

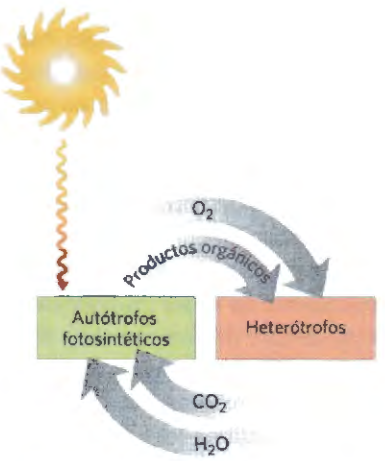


FIGURA 1 Ciclo del dióxido de carbono y del oxígeno entre los dominios autotrófico (fotosintético) y heterotrófico en la biosfera. El flujo de masa a través del ciclo es enorme; se transforman anualmente alrededor de 4 x 10^{11} toneladas métricas de carbono en la biosfera.

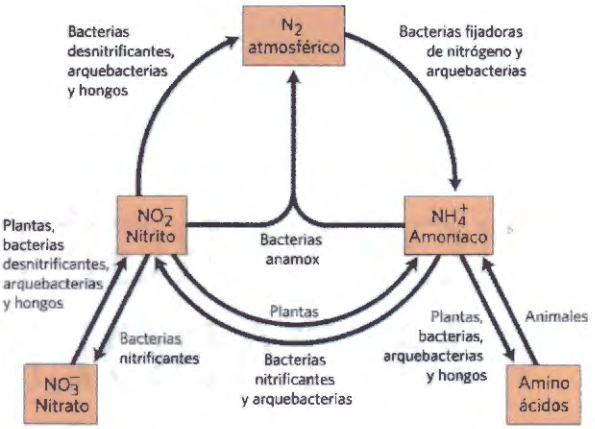


FIGURA 2 Ciclo del nitrógeno en la biosfera. El nitrógeno gas (N_2) constituye el 80% de la atmósfera terrestre.

útil (energía libre) y un aumento inevitable de la cantidad de energía no utilizable (calor y entropía). Por tanto, a diferencia del ciclado de la materia, la energía fluye en una sola dirección a través de la biosfera; los organismos no pueden regenerar energía útil a partir de energía disipada en forma de calor y entropía. Carbono, oxígeno y nitrógeno se reciclan continuamente pero la energía se transforma constantemente en formas no utilizables como el calor.

El **metabolismo,** que es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las **rutas metabólicas**. Cada uno de los pasos consecutivos de una ruta metabólica ocasiona un pequeño cambio químico específico, normalmente la eliminación, transferencia o adición de un átomo o grupo funcional determinado. El precursor se convierte en producto a través de una serie de intermediarios metabólicos denominados **metabolitos**. El término **metabolismo intermediario** se aplica a menudo a las actividades combinadas de todas las rutas metabólicas que interconvierten precursores, metabolitos y productos de baja masa molecular (generalmente $M_r < 1.000$).

El **catabolismo** es la fase degradativa del metabolismo en el que moléculas nutrientes orgánicas (glúcidos, grasas y proteínas) se convierten en productos más pequeños y sencillos (por ej., ácido láctico, CO_2 y NH_3). Las rutas catabólicas liberan energía, parte de la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (NADH, NADPH y $FADH_2$); el resto se pierde en forma de calor. En el **anabolismo**, también llamado biosíntesis, precursores pequeños y sencillos se integran en moléculas mucho mayores y complejas entre las que se incluyen los lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Las reacciones anabólicas requieren un aporte de energía, generalmente en forma del potencial de transferencia del grupo

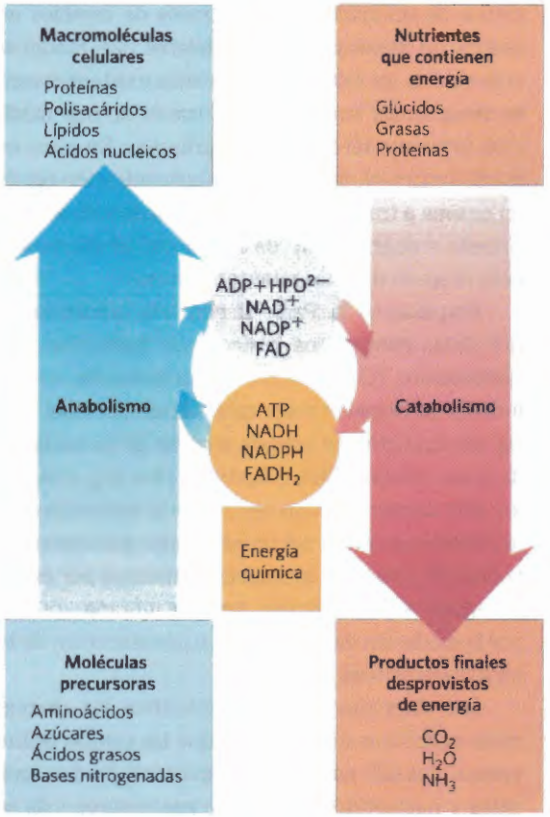


FIGURA 3 El gran cuadro general: relaciones energéticas entre rutas catabólicas y anabólicas. Las rutas catabólicas suministran energía química en forma de ATP, NADH, NADPH, y $FADH_2$. Estos transportadores de energía se utilizan en las rutas anabólicas para convertir moléculas precursoras pequeñas en macromoléculas celulares.

fosforilo del ATP y el poder reductor del NADH, NADPH y $FADH_2$ **(Fig. 3)**.

Algunas rutas metabólicas son lineales y otras son ramificadas, dando varios productos finales útiles a partir de un solo precursor o convirtiendo varios materiales de partida en un solo producto. En general, las rutas catabólicas son *convergentes* mientras que las anabólicas son *divergentes* **(Fig. 4)**. Algunas rutas son cíclicas: uno de los componentes iniciales de la ruta se regenera en una serie de reacciones que convierten otro material de partida en un producto. En los siguientes capítulos veremos ejemplos de cada tipo de ruta.

La mayoría de células contienen los enzimas para llevar a cabo tanto la degradación como la síntesis de las categorías importantes de biomoléculas - ácidos grasos, por ejemplo-. La síntesis y degradación simultáneas de ácidos grasos sería sin embargo un despilfarro, que se evita regulando recíprocamente las secuencias de reacciones anabólicas y catabólicas: cuando una tiene lugar la otra está suprimida. Tal regulación no podría tener lugar si las rutas anabólica y catabólica estuviesen catalizadas por exactamente el mismo conjunto de enzimas, operando en una dirección para el anabolismo y en la opuesta para el catabolismo: la inhibición de un enzima implicado en el catabolismo también inhibiría la secuencia de reacciones en la dirección anabólica. Las rutas catabólica y anabólica que conectan los mismos puntos finales (glucosa → → piruvato y piruvato → → glucosa, por ejemplo) pueden emplear muchos enzimas de forma común pero, invariablemente, al menos uno de los pasos está catalizado por enzimas diferentes en las direcciones anabólica y catabóli-

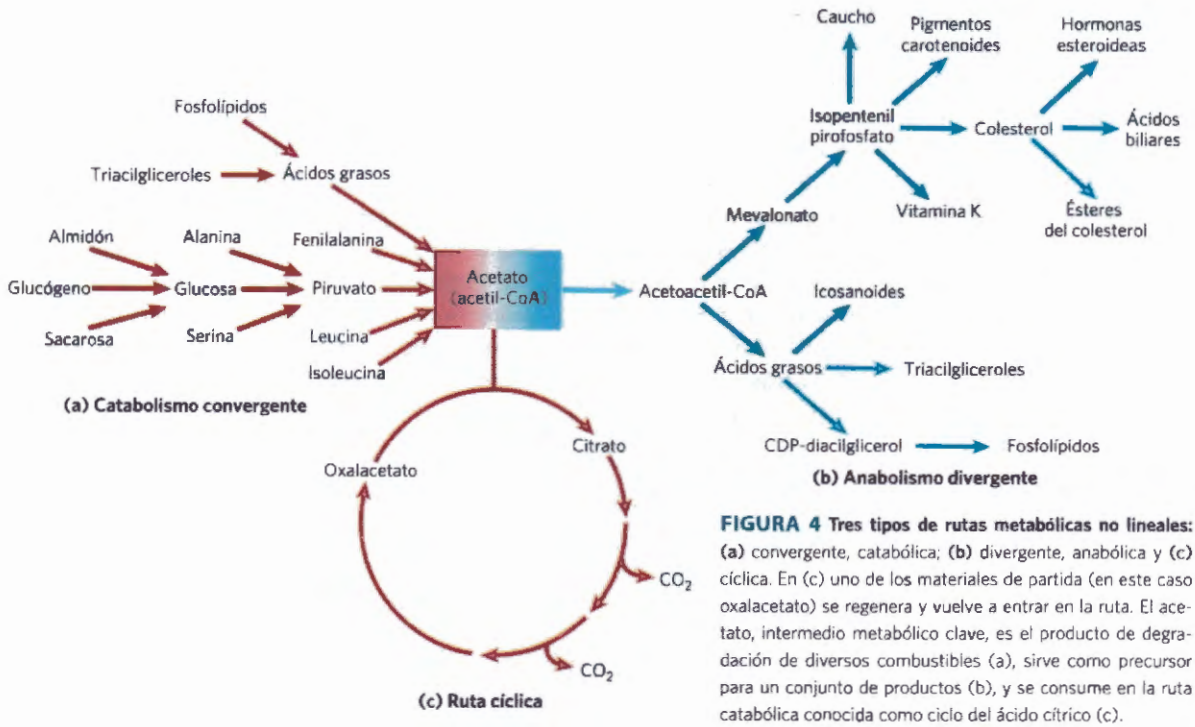


FIGURA 4 Tres tipos de rutas metabólicas no lineales: (a) convergente, catabólica; **(b)** divergente, anabólica y **(c)** cíclica. En (c) uno de los materiales de partida (en este caso oxalacetato) se regenera y vuelve a entrar en la ruta. El acetato, intermedio metabólico clave, es el producto de degradación de diversos combustibles (a), sirve como precursor para un conjunto de productos (b), y se consume en la ruta catabólica conocida como ciclo del ácido cítrico (c).

ca, siendo estos enzimas los sitios de regulación específicos. Además, para que tanto la ruta anabólica como la catabólica sean esencialmente irreversibles, las reacciones que son específicas de cada dirección deben incluir por lo menos una que sea termodinámicamente muy favorable; dicho de otro modo, una reacción para la cual la reacción inversa sea muy desfavorable. Como una contribución más a la regulación independiente de las secuencias de reacción catabólica y anabólica, los pares de rutas anabólicas y catabólicas se dan frecuentemente en compartimientos celulares diferentes: por ejemplo, el catabolismo de los ácidos grasos en la mitocondria, la síntesis de ácidos grasos en el citosol. Las concentraciones de intermedios, enzimas y reguladores se pueden mantener a niveles diferentes en estos compartimientos separados. Puesto que las rutas metabólicas están sujetas a control cinético por la concentración de sustrato, los depósitos separados de intermedios anabólicos y catabólicos contribuyen también al control de las velocidades metabólicas. Los dispositivos para la separación de procesos anabólicos y catabólicos serán de interés especial en nuestra discusión del metabolismo.

Las rutas metabólicas están reguladas a varios niveles, tanto desde el interior de la célula como desde el exterior. La regulación más inmediata es a través de la disponibilidad de sustrato; cuando la concentración intracelular del sustrato de un enzima está próxima o por debajo de la K_m (tal como sucede frecuentemente), la velocidad de la reacción depende fuertemente de la concentración de sustrato (véase la Fig. 6-11). Un segundo tipo de control rápido desde el interior es la regulación alostérica por un intermediario metabólico o coenzima (un aminoácido o ATP, por ejemplo) que señala el estado metabólico interno de la célula. Cuando la célula tiene una cantidad suficiente de aspartato, por ejemplo, para sus necesidades inmediatas, o cuando el nivel celular de ATP indica que no es necesario de momento un consumo adicional de combustible, estas señales inhiben de forma alostérica la actividad de uno o más enzimas de la ruta pertinente. En los organismos multicelulares las actividades metabólicas de los diferentes tejidos son reguladas e integradas por factores de crecimiento y hormonas que actúan desde el exterior de la célula. En algunos casos, esta regulación tiene lugar de forma prácticamente instantánea (algunas veces en menos de un milisegundo) a través de cambios en los niveles de mensajeros intracelulares que modifican la actividad de las moléculas de enzima existentes mediante mecanismos alostéricos o a través de una modificación covalente tal como la fosforilación. En otros casos, la señal extracelular modifica la concentración celular de un enzima a través de la alteración de la velocidad de su síntesis o degradación. de forma que el efecto sólo se nota después de unos minutos u horas.

Empezamos la Parte II con una discusión de los principios energéticos básicos que gobiernan todo el metabolismo (Capítulo 13). A continuación consideramos las principales rutas catabólicas mediante las que las células obtienen energía a partir de la oxidación de diversos combustibles (Capítulos 14 a 20). Los Capítulos 19 y 20 son el punto central de la discusión sobre el metabolismo; tratan del acoplamiento quimiosmótico de la energía, que es el mecanismo universal por el que un potencial electroquímico transmembrana, producido por la oxidación de un sustrato o por absorción de la luz, impulsa la síntesis de ATP.

Los Capítulos 20 a 22 describen las principales rutas anabólicas mediante las que las células utilizan la energía del ATP para producir glúcidos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos a partir de precursores más sencillos. En el Capítulo 23 nos alejamos de nuestra visión detallada de las rutas metabólicas (tal como se dan en todos los organismos desde *Escherichia coli* a los seres humanos) y consideramos de qué modo están reguladas e integradas en los mamíferos mediante mecanismos hormonales.

Pero antes de empezar el estudio del metabolismo intermediario, una última palabra. Intente no olvidar que la pléyade de reacciones descritas en estas páginas se dan en organismos vivos en los que juegan papeles cruciales. Pregúntese sobre cada reacción y cada ruta ¿Qué consigue el organismo con esta transformación química? ¿Cómo se interconecta esta ruta con las restantes rutas que tienen lugar simultáneamente en la misma célula para obtener la energía y los productos requeridos para el mantenimiento y crecimiento celulares? Estudiado con esta perspectiva, el metabolismo proporciona conocimientos fascinantes y reveladores sobre la vida, con incontables aplicaciones en medicina, agricultura y biotecnología.

CAPÍTULO 13

Bioenergética y tipos de reacción bioquímicos

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

13.1 Bioenergética y termodinámica 496

13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes 501

13.3 Transferencias del grupo fosforilo y ATP 507

13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas 517

Las células y los organismos vivos han de desarrollar trabajo para permanecer vivos, crecer y reproducirse. La capacidad de aprovechar la energía y canalizarla en trabajo biológico es una propiedad fundamental de todos los organismos vivos; debió ser adquirida muy pronto en la evolución celular. Los organismos modernos realizan una notable variedad de transducciones de energía, conversiones de una forma de energía a otra. Utilizan la energía química de los combustibles para conseguir la síntesis de macromoléculas complejas, altamente ordenadas, a partir de precursores sencillos. También convierten la energía química de los combustibles en gradientes de concentración y gradientes eléctricos, en movimiento, calor e incluso, en algunos organismos como las luciérnagas y algunos peces abisales, en luz. Los organismos fotosintéticos transducen la energía luminosa en todas estas otras formas de energía.

Los mecanismos químicos en los que se basan las transducciones biológicas de energía han fascinado y desafiado a los biólogos durante siglos. El químico francés Antoine Lavoisier reconoció que los animales transforman de algún modo los combustibles químicos (alimentos) en calor y que este proceso de la respiración es esencial para la vida. Observó que

> ...en general, la respiración no es más que una combustión lenta de carbono e hidrógeno, que es totalmente similar a lo que ocurre en una lámpara o candela encendidas y que, desde este punto de vista, los animales que respiran son verdaderos cuerpos combustibles que se queman y consumen a si mismos...Uno podría decir que esta analogía entre combustión y respiración no ha escapado a la observación de los poetas, o más bien de los filósofos de la antigüedad, quienes la han comentado e interpretado. Este fuego robado del cielo, esta antorcha de Prometeo, no representa solamente una idea ingeniosa y poética, es una representación fiel de las operaciones de la naturaleza, al menos en lo que respecta a los animales que respiran; uno puede decir, por tanto, con los antiguos, que la antorcha de la vida se enciende a sí misma en el momento en que un recién nacido respira por primera vez y no se extingue sino con la muerte*.



Antoine Lavoisier, 1743–1794 [Fuente: INTERFOTO/Alamy.]

En el siglo XX, se empezó a conocer una gran parte de la química en que se basa esta "antorcha de la vida". Las transducciones biológicas de energía obedecen las mismas leyes químicas y físicas que gobiernan el resto de procesos naturales. Es, por tanto, esencial para el estudiante de bioquímica entender estas leyes y la forma en que son aplicables al flujo de energía en la biosfera.

En este capítulo revisaremos primeramente las leyes de la termodinámica y las relaciones cuantitativas entre energía libre, entalpía y entropía. Describiremos seguidamente los tipos de reacciones bioquímicas comunes que tienen lugar en las células vivas, reacciones que aprovechan, almacenan, transfieren y liberan la energía captada por los organismos a partir de su entorno. Nuestro interés se desplazará seguidamente a las reacciones que tienen un papel especial en los intercambios de energía biológicos, y en particular del ATP. Finalmente, consideraremos la importancia de las reac-

* De una memoria de Armand Seguin y Antoine Lavoisier, fechada en 1789, citada en Lavoisier, A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Impériale, Paris.

ciones de oxidación-reducción en las células vivas, la energética de las reacciones de transferencia de electrones, y los transportadores de electrones empleados normalmente como cofactores en estos procesos.

13.1 Bioenergética y termodinámica

La bioenergética es el estudio cuantitativo de las **transducciones de energía**, cambios de una forma de energía en otra, que tienen lugar en las células vivas y de la naturaleza y función de los procesos químicos sobre los que se basan estas transducciones. Aunque muchos de los principios de la termodinámica ya se han introducido en capítulos anteriores y pueden serles familiares, vale la pena revisar aquí los aspectos cuantitativos de estos principios.

Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica

Muchas observaciones cuantitativas realizadas por físicos y químicos sobre la interconversión de las diferentes formas de energía condujeron a la formulación, en el siglo XIX, de dos leyes fundamentales de la termodinámica. La primera ley es el principio de conservación de la energía: *en cualquier cambio físico o químico, la cantidad total de energía en el universo permanece constante; la energía puede cambiar de forma o puede ser transportada de una región a otra, pero no puede ser creada o destruida.* La segunda ley de la termodinámica, que se puede enunciar de diversas maneras, dice que el universo tiende siempre hacia un aumento del desorden: *en todos los procesos naturales, aumenta la entropía del universo.*

Los organismos vivos consisten en colecciones de moléculas mucho más organizadas que los materiales circundantes a partir de las cuales están construidas, y mantienen y producen orden, aparentemente inconscientes de la segunda ley de la termodinámica. Pero los organismos vivos no violan la segunda ley sino que operan estrictamente dentro de ella. Para discutir la aplicación de la segunda ley a los sistemas biológicos, debemos definir primero estos sistemas y su entorno.



"Bien, la 2ª ley de la termodinámica dice que..")

[Fuente: Sidney Harris.]

El *sistema de reacción* es el conjunto de materia que está experimentando un proceso químico o físico determinado; puede ser un organismo, una célula o dos compuestos que reaccionan. El sistema de reacción y su *entorno* conjuntamente constituyen el *universo*. En el laboratorio, algunos procesos químicos o físicos pueden llevarse a cabo en sistemas aislados o cerrados, en los que no se intercambia materia o energía con el entorno. Sin embargo, las células y organismos vivos son sistemas abiertos que intercambian tanto materiales como energía con su entorno; los sistemas vivos no están nunca en equilibrio con su entorno, y las constantes transacciones entre el sistema y el entorno explican cómo los organismos pueden crear orden en su interior al tiempo que operan dentro de la segunda ley de la termodinámica.

En el Capítulo 1 hemos definido tres cantidades termodinámicas que describen los cambios de energía que tienen lugar en una reacción química:

La **energía libre de Gibbs (G)**, expresa la cantidad de energía capaz de realizar trabajo durante una reacción a temperatura y presión constantes. Cuando una reacción transcurre con liberación de energía libre (es decir cuando el sistema cambia de manera que tiene al final menos energía libre), la variación de energía libre, ΔG, tiene signo negativo y se dice que la reacción es **exergónica**. En las reacciones **endergónicas**, el sistema gana energía libre por lo que ΔG es positiva.

La **entalpía, H**, es el contenido calórico del sistema de reacción. Refleja el número y clase de enlaces químicos en los reactivos y productos. Cuando una reacción química libera calor, se dice que es **exotérmica**; el contenido calórico de los productos es menor que el de los reactivos y ΔH tiene, por convención, un valor negativo. Los sistemas de reacción que toman calor del entorno son **endotérmicos** y tienen valores positivos de ΔH.

La **entropía, S,** es una expresión cuantitativa de la aleatoriedad o desorden de un sistema (véase el Recuadro 1-3). Cuando los productos de una reacción son menos complejos y más desordenados que los reactivos se dice que la reacción transcurre con ganancia de entropía.

Las unidades de ΔG y ΔH son joules/mol o calorías/mol (recuérdese que 1 cal = 4,184 J); las unidades de entropía son joules/mol·Kelvin (J/mol·K) (Tabla 13-1).

En las condiciones existentes en los sistemas biológicos (incluyendo temperatura y presión constantes), las variaciones en energía libre, entalpía y entropía están relacionadas cuantitativamente entre sí por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (13\text{-}1)$$

en la que ΔG es el cambio de energía libre de Gibbs del sistema de reacción, ΔH es el cambio de entalpía del sistema, T es la temperatura absoluta y ΔS es el cambio de entropía del sistema. Por convención, ΔS tiene signo positivo cuando aumenta la entropía y ΔH, como se ha indicado anteriormente, tiene signo negativo cuando se libera calor del sistema a su entorno. Cualquiera de

TABLA 13-1 Algunas constantes y unidades físicas utilizadas frecuentemente en termodinámica

Constante de Boltzmann, $\mathbf{k} = 1{,}381 \times 10^{-23}$ J/K
Número de Avogadro, $N = 6{,}022 \times 10^{23}\ mol^{-1}$
Constante de Faraday, $F = 96.480$ J/V·mol
Constante de los gases, $R = 8{,}315$ J/mol·K
(=1,987 cal/mol·K

Las unidades de ΔG y ΔH son J/mol (o cal/mol)
Las unidades de ΔS son J/mol·K (o cal/mol·K)
1 cal = 4,184 J

Las unidades de temperatura absoluta, T, son grados Kelvin, K
25 °C = 298 K
At 25 °C, RT = 2,478 kJ/mol
(=0,592 kcal/mol)

estas condiciones, que son típicas de los procesos energéticamente favorables, tienden a hacer ΔG negativo. De hecho, ΔG de un sistema que reacciona espontáneamente es siempre negativo.

La segunda ley de la termodinámica establece que la entropía *del universo* aumenta durante todos los procesos químicos y físicos, pero no requiere que el incremento de entropía tenga lugar en el propio *sistema de reacción*. El orden producido en el interior de las células a medida que crecen y se dividen está compensado de sobras por el desorden que se crea en su entorno en el transcurso del crecimiento y división (véase el Recuadro 1-3, caso 2). En pocas palabras, los organismos vivos conservan su orden interno tomando de su entorno energía libre en forma de nutrientes o de luz solar, y devolviendo al entorno una cantidad igual de energía en forma de calor y entropía.

Las células precisan fuentes de energía libre

Las células son sistemas isotérmicos ya que funcionan a temperatura prácticamente constante (y también a presión constante). El flujo de calor no es una fuente de energía para las células porque el calor puede realizar trabajo solamente cuando pasa a una zona u objeto a menor temperatura. La energía que las células pueden y deben utilizar es la energía libre, descrita por la función de energía libre de Gibbs, G, que permite la predicción de la dirección de las reacciones químicas, su posición exacta de equilibrio y la cantidad de trabajo que pueden llevar a cabo, teóricamente, a temperatura y presión constantes. Las células heterotróficas adquieren energía libre de las moléculas de nutrientes, y las células fotosintéticas la adquieren de la radiación solar absorbida. Ambos tipos de células transforman esta energía libre en ATP y otros compuestos ricos en energía capaces de proporcionar energía para trabajo biológico a temperatura constante.

La variación de energía libre estándar está directamente relacionada con la constante de equilibrio

La composición de un sistema de reacción (una mezcla de reactivos y productos químicos) tiende a continuar cambiando hasta que se llega al equilibrio. A la concentración de equilibrio de reactivos y productos las velocidades de las reacciones directa e inversa son exactamente iguales y no se produce ningún otro cambio neto en el sistema. Las concentraciones de reactivos y productos *en el equilibrio* definen la constante de equilibrio, K_{eq}: En la reacción general

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$$

en donde a, b, c y d son el número de moléculas de A, B, C y D que participan, la constante de equilibrio viene dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad (13\text{-}2)$$

en donde [A], [B], [C] y [D] son las concentraciones molares de los componentes de la reacción en el *punto de equilibrio*.

Cuando un sistema de reacción no está en equilibrio, la tendencia a desplazarse hacia el equilibrio representa una fuerza motriz, cuya magnitud se puede expresar como el cambio de energía libre para la reacción, ΔG. En condiciones estándar (298 K = 25 °C), cuando reactivos y productos se hallan inicialmente presentes a concentración 1 M o, para los gases, a presiones parciales de 101,3 kilopascales (kPa) o 1 atm, la fuerza propulsora del sistema hacia el equilibrio se define como la variación de energía libre estándar, $\Delta G°$. Según esta definición el estado estándar de reacciones en las que intervienen iones hidrógeno es $[H^+] = 1$ M, o pH = 0. Sin embargo, la mayoría de reacciones bioquímicas tienen lugar en soluciones acuosas bien tamponadas cercanas a pH 7; tanto el pH como la concentración del agua (55,5 M) son prácticamente constantes.

›› **Convención clave:** Por conveniencia de cálculo, los bioquímicos definen un estado estándar diferente del utilizado en química y física: en el estado estándar bioquímico $[H^+]$ es 10^{-7} M (pH 7) y $[H_2O]$ es 55,5 M; para las reacciones en que interviene el Mg^{2+} (incluidas la mayoría de reacciones en que el ATP es el sustrato), $[Mg^{2+}]$ en disolución se considera normalmente constante a 1 mM. ‹‹

Las constantes físicas basadas en este estado estándar bioquímico se denominan **constantes estándar transformadas** y se escriben con una prima (por ej., $\Delta G'°$ y K'_{eq}) para distinguirlas de las constantes sin transformar usadas por químicos y físicos. (Observe que la mayoría de libros de texto utilizan el símbolo $\Delta G°'$ en lugar de $\Delta G'°$. Nuestra utilización de $\Delta G'°$, recomendada por un comité internacional de químicos y bioquímicos, está destinado a resaltar que la energía libre transformada $\Delta G'$ es el criterio para el equilibrio). Por razones de simplicidad, a partir de este momento nos referiremos a las constantes transformadas como **variaciones de energía libre estándar** y **constantes de equilibrio estándar.**

›› **Convención clave:** En otra convención simplificadora utilizada por los bioquímicos, cuando H_2O, H^+, o Mg^{2+} son reactivos o productos, no se incluyen sus concentraciones en ecuaciones tales como la Ecuación 13-2

pero, no obstante, se incorporan en las constantes $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq}. «

De la misma manera que K'_{eq} es una constante física característica de cada reacción, también $\Delta G'^{\circ}$ es una constante. Tal como se indicó en el Capítulo 6, existe una relación sencilla entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \qquad (13\text{-}3)$$

La variación de energía libre estándar de una reacción química es simplemente una forma matemática alternativa de expresar su constante de equilibrio. La Tabla 13-2 muestra la relación entre $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq}. Si la constante de equilibrio de una reacción química determinada es 1,0, la variación de energía libre estándar de esta reacción es 0,0 (el logaritmo natural de 1,0 es cero). Si K'_{eq} de una reacción es mayor que 1,0, su $\Delta G'^{\circ}$ es negativo. Si K'_{eq} es menor que 1,0, $\Delta G'^{\circ}$ es positivo. Puesto que la relación entre $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq} es exponencial, a cambios relativamente pequeños de $\Delta G'^{\circ}$ corresponden grandes cambios en K'_{eq}.

Puede ser útil pensar acerca de la variación de energía libre estándar de una forma diferente. $\Delta G'^{\circ}$ es la diferencia entre el contenido de energía libre de los productos y el contenido en energía libre de los reactivos en condiciones estándar. Cuando $\Delta G'^{\circ}$ es negativa, los productos contienen menos energía libre que los reactivos y la reacción transcurrirá de forma espontánea en condiciones estándar; todas las reacciones químicas tienden a ir en la dirección que da lugar a una disminución de la energía libre del sistema. Un valor de $\Delta G'^{\circ}$ positivo significa que los productos de la reacción contienen más energía libre que los reactivos y, por tanto, esta reacción tenderá a transcurrir en la dirección inversa si empezamos con concentraciones 1,0 M de todos los componentes (condiciones estándar). La Tabla 13-3 resume estos puntos.

TABLA 13-2 Relación entre las constantes de equilibrio y las variaciones de energía libre estándar de reacciones químicas

	$\Delta G'^{\circ}$	
K'_{eq}	(kJ/mol)	(kcal/mol*)
10^{3}	−17,1	−4,1
10^{2}	−11,4	−2,7
10^{1}	−5,7	−1,4
1	0,0	0,0
10^{-1}	5,7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

*Aunque julios y kilojulios son las unidades estándar de energía y se utilizan a todo lo largo de este texto, los bioquímicos y los nutricionistas expresan a veces los valores de $\Delta G'^{\circ}$ en kilocalorías por mol. Hemos incluido, por tanto, los valores tanto en kilojulios como en kilocalorías en esta tabla y en las Tablas 13-4 y 13-6. Para convertir kilojulios en kilocalorías, divida el número de kilojulios por 4,184.

TABLA 13-3 Relaciones entre K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ y dirección de las reacciones químicas en condiciones estándar

Cuando K'_{eq} es...	$\Delta G'^{\circ}$ es...	Empezando con todos los componentes 1 M, la reacción...
> 1,0	negativa	transcurre hacia delante
1,0	cero	se encuentra en el equilibrio
< 1,0	positiva	transcurre en sentido inverso

EJEMPLO PRÁCTICO 13-1 Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$

Calcule el cambio de energía libre estándar de la reacción catalizada por el enzima fosfoglucomutasa:

Glucosa 1-fosfato ⇌ glucosa 6-fosfato

dado que si empezamos con glucosa 1-fosfato 20 mM (pero sin glucosa-6-fosfato) la mezcla final en el equilibrio contendrá glucosa 1-fosfato 1,0 mM y glucosa 6-fosfato 19 mM a 25°C y pH 7,0. La reacción en la dirección de formación de glucosa 6-fosfato ¿transcurre con una pérdida o una ganancia de energía libre?

Solución: Calculemos en primer lugar la constante de equilibrio:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{glucosa 6-fosfato}]}{[\text{glucosa 1-fosfato}]} = \frac{19 \text{ mM}}{1.0 \text{ mM}} = 19$$

Podemos ahora calcular la variación de energía libre estándar:

$$\begin{aligned}\Delta G'^{\circ} &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -(8.315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K})(\ln 19) \\ &= -7.3 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Debido a que la variación de energía libre estándar es negativa, la conversión de la glucosa 1-fosfato a glucosa 6-fosfato transcurre con una pérdida (liberación) de energía libre. (Para la reacción inversa $\Delta G'^{\circ}$ tiene la misma magnitud pero signo *opuesto*).

La Tabla 13-4 muestra las variaciones de energía libre estándar de varias reacciones químicas representativas. Obsérvese que la hidrólisis de ésteres, amidas, péptidos y glucósidos sencillos, así como los reordenamientos y eliminaciones transcurren con variaciones de energía libre estándar relativamente pequeñas, mientras que la hidrólisis de anhídridos de ácido tiene lugar con disminuciones relativamente grandes de energía libre estándar. La oxidación completa de compuestos orgánicos tales como la glucosa o el palmitato a CO_2 y H_2O, que en las células requiere muchos pasos, trans-

TABLA 13-4 Variaciones de energía libre estándar de algunas reacciones químicas

Tipo de reacción	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kcal/mol
Reacciones de hidrólisis		
Anhídridos de ácido		
Anhídrido acético + H_2O → 2 acetato	−91,1	−21,8
ATP + H_2O → ADP + P_i	−30,5	−7,3
ATP + H_2O → AMP + PP_i	−45,6	−10,9
PP_i + H_2O → 2P_i	−19,2	−4,6
UDP-glucosa + H_2O → UMP + glucosa 1-fosfato	−43,0	−10,3
Ésteres		
Acetato de etilo + H_2O → etanol + acetato	−19,6	−4,7
Glucosa 6-fosfato + H_2O → glucosa + P_i	−13,8	−3,3
Amidas y péptidos		
Glutamina + H_2O → glutamato + NH_4^+	−14,2	−3,4
Glicilglicina + H_2O → 2 glicina	−9,2	−2,2
Glucósidos		
Maltosa + H_2O → 2 glucosa	−15,5	−3,7
Lactosa + H_2O → glucosa + galactosa	−15,9	−3,8
Reordenamientos		
Glucosa 1-fosfato → glucosa 6-fosfato	−7,3	−1,7
Fructosa 6-fosfato → glucosa 6-fosfato	−1,7	−0,4
Eliminación de agua		
Malato → fumarato + H_2O	3,1	0,8
Oxidaciones con oxígeno molecular		
Glucosa + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	−2.840	−686
Palmitato + $23O_2$ → $16CO_2$ + $16H_2O$	−9.770	−2.338

curre con descensos de energía libre estándar muy grandes. No obstante, las variaciones de energía libre estándar tales como las de la Tabla 13-4 nos dicen cuánta energía libre está disponible en una reacción en *condiciones estándar*. Para describir la energía liberada en las condiciones que existen en las células es necesaria una expresión para la variación de energía libre *real*.

El cambio de energía libre real depende de las concentraciones de reactivos y productos

Hemos de tener cuidado en distinguir entre dos cantidades diferentes, la variación de energía libre real, ΔG, y el cambio de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$. Cada reacción química tiene una variación de energía libre estándar característica, que puede ser positiva, negativa o cero, según sea la constante de equilibrio de la reacción. La variación de energía libre estándar nos dice en qué dirección y hasta qué punto debe transcurrir una reacción determinada para alcanzar el equilibrio *cuando la concentración inicial de cada componente es 1,0 M*, el pH es 7,0, la temperatura 25 °C, y la presión 101,3 kPa (1 atm). Así, $\Delta G'^{\circ}$ es una constante: tiene un valor característico, fijo, para una reacción determinada. Pero la variación de energía libre *real*, ΔG, es función de las concentraciones de reactivos y productos y de la temperatura que se den durante la reacción, que no tienen por qué coincidir necesariamente con las condiciones estándar definidas anteriormente. Además, ΔG de cualquier reacción que transcurra espontáneamente hacia el equilibrio es siempre negativa, se hace menos negativa a medida que transcurre la reacción, y es cero en el punto de equilibrio indicando que la reacción ya no puede realizar más trabajo.

ΔG y $\Delta G'^{\circ}$ para cualquier reacción aA + bB ⇌ cC + dD están relacionadas por la ecuación

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad (13\text{-}4)$$

en la que los términos en rojo son los que se *dan realmente* en el sistema en observación. Los términos de concentración de esta ecuación expresan los efectos denominados comúnmente acción de masas mientras que el término $[C]^c[D]^d/[A]^a[B]^b$ se denomina **razón de la acción de masas, Q.** Así, la Ecuación 13-4 se puede expresar como $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT\ln Q$. Supongamos, a guisa de ejemplo, que la reacción A + B ⇌ C + D tiene lugar en las condiciones estándar de temperatura (25 °C) y presión (101,3 kPa) pero que las concentraciones de A, B, C y D *no* son iguales y que ninguno de

los componentes está presente a la concentración estándar de 1,0 M. Para determinar la variación de energía libre real, ΔG, que tendrá lugar en estas condiciones de concentración no estándar a medida que la reacción transcurre de izquierda a derecha, simplemente colocamos las concentraciones *reales* de A, B, C y D en la Ecuación 13-4; los valores de R, T y $\Delta G'^{\circ}$ son los valores estándar. ΔG será negativa y se aproximará a cero a medida que la reacción transcurra debido a que las concentraciones reales de A y B serán cada vez más pequeñas y las concentraciones de C y D serán cada vez mayores. Obsérvese que cuando una reacción se halla en el equilibrio, en donde no existe fuerza impulsora para la reacción en ninguna de las dos direcciones y ΔG es cero, la Ecuación 13-4 se simplifica a

$$0 = \Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

o

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$

la ecuación que relaciona la variación de energía libre estándar con la constante de equilibrio (Ecn. 13-3).

El criterio para la espontaneidad de una reacción es el valor de ΔG, no $\Delta G'^{\circ}$. Una reacción con $\Delta G'^{\circ}$ positiva puede transcurrir en la dirección directa *si ΔG es negativa*. Esto es posible si el término $RT\ln$([productos]/[reactivos]) de la Ecuación 13-4 es negativo y tiene un valor absoluto mayor que $\Delta G'^{\circ}$. Por ejemplo, la eliminación inmediata de los productos de una reacción puede mantener el cociente [productos]/[reactivos] muy por debajo de 1, de forma que el término $RT\ln$([productos]/[reactivos]) tenga un valor negativo grande. $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG son expresiones de la cantidad *máxima* de energía libre que una reacción dada puede, *teóricamente*, suministrar -una cantidad de energía que sólo se podría utilizar si hubiera disponible un dispositivo perfectamente eficiente que la capturase o la aprovechase. Dado que un dispositivo tal no es posible (durante cualquier proceso siempre se pierde una parte de la energía libre en forma de entropía), la cantidad de trabajo realizada por la reacción a temperatura y presión constantes siempre es menor que la cantidad teórica.

Otro aspecto importante es que algunas reacciones que son termodinámicamente favorables (es decir, aquellas para las que $\Delta G'^{\circ}$ es grande y negativa) no tienen lugar a velocidades observables. Por ejemplo, la combustión de la leña a CO_2 y H_2O es muy favorable termodinámicamente, pero la leña es estable durante años debido a que la energía de activación (véanse las Figs. 6-2 y 6-3) para la reacción de combustión es superior a la energía disponible a temperatura ambiente. Si se suministra la energía de activación necesaria (con una cerilla encendida, por ejemplo), empieza la combustión, convirtiendo la madera en los productos CO_2 y H_2O más estables, al tiempo que se libera energía en forma de calor y luz. El calor liberado por esta reacción exotérmica proporciona la energía de activación para la combustión de regiones adyacentes de la leña; el proceso se autoperpetúa.

En las células vivas, las reacciones que serían extremadamente lentas *si no estuviesen catalizadas*, se consigue que tengan lugar, no suministrando calor adicional, sino disminuyendo la energía de activación con un enzima. Un enzima proporciona una ruta de reacción alternativa con una energía de activación más baja que la de la reacción sin catalizar, de modo que a temperatura ambiente una gran parte de las moléculas de sustrato tienen suficiente energía térmica para superar la barrera de activación, y la velocidad de reacción aumenta de forma espectacular. *La variación de energía libre de una reacción es independiente de la ruta por la que discurra la reacción*; sólo depende de la naturaleza y concentración de los reactivos iniciales y de los productos finales. *Los enzimas no pueden, por tanto, cambiar las constantes de equilibrio*; pero pueden aumentar la *velocidad* a la que se da la reacción en la dirección dictada por la termodinámica (véase la Sección 6.2).

Las variaciones de energía libre estándar son aditivas

En el caso de dos reacciones químicas secuenciales, $A \rightleftharpoons B$ y $B \rightleftharpoons C$, cada reacción tiene su propia constante de equilibrio y cada una tiene su variación de energía libre estándar característica, $\Delta G'^{\circ}_1$ y $\Delta G'^{\circ}_2$. Como las dos reacciones son secuenciales, B puede eliminarse para dar la reacción global $A \rightleftharpoons C$, que tiene su propia constante de equilibrio y por tanto su propia variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}_{total}$. *Los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de reacciones químicas secuenciales son aditivos.* Para la reacción global $A \rightleftharpoons C$, $\Delta G'^{\circ}_{total}$ es la suma de las variaciones de energía libre estándar individuales, $\Delta G'^{\circ}_1$ y $\Delta G'^{\circ}_2$, de las dos reacciones: $\Delta G'^{\circ}_{total} = \Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$.

(1)	$A \longrightarrow \cancel{B}$	$\Delta G'^{\circ}_1$
(2)	$\cancel{B} \longrightarrow C$	$\Delta G'^{\circ}_2$
Suma:	$A \longrightarrow C$	$\Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$

Este principio de la bioenergética explica por qué una reacción termodinámicamente desfavorable (endergónica) puede ser impulsada en el sentido directo acoplándola a una reacción muy exergónica a través de un intermedio común. Por ejemplo, en muchos organismos la síntesis de glucosa 6-fosfato es el primer paso en la utilización de la glucosa. En principio, la síntesis podría obtenerse mediante la reacción:

$$\text{Glucosa} + P_i \longrightarrow \text{glucosa 6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G'^{\circ} = 13.8 \text{ kJ/mol}$$

Pero el valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ predice que en condiciones estándar la reacción no tenderá a producirse espontáneamente en la dirección escrita. Otra reacción celular, la hidrólisis de ATP a ADP y Pi, es muy exergónica:

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i \quad \Delta G'^{\circ} = -30.5 \text{ kJ/mol}$$

Estas dos reacciones comparten los intermedios comunes P_i y H_2O por lo que se pueden expresar como reacciones secuenciales:

(1)	Glucosa + $\cancel{P_i}$	$\longrightarrow$ glucosa 6-fosfato + $\cancel{H_2O}$
(2)	ATP + $\cancel{H_2O}$	$\longrightarrow$ ADP + $\cancel{P_i}$

Suma: ATP + glucosa $\longrightarrow$ ADP + glucosa 6-fosfato

La variación de energía libre estándar global se obtiene sumando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de las reacciones individuales:

$$\Delta G'^{\circ}_{\text{Suma}} = 13.8 \text{ kJ/mol} + (-30.5 \text{ kJ/mol}) = -16.7 \text{ kJ/mol}$$

La reacción global es exergónica. En este caso la energía almacenada en el ATP se utiliza para impulsar la síntesis de glucosa 6-fosfato, aunque su formación a partir de glucosa y fosfato inorgánico (P_i) es endergónica. La *ruta* de formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa por transferencia de fosforilo desde el ATP es diferente de las dos reacciones anteriores (1) y (2), pero el resultado neto es el mismo que la suma de las dos reacciones. En los cálculos termodinámicos, lo único que importa es el estado del sistema en el inicio del proceso y su estado al final; la ruta entre los estados inicial y final es irrelevante.

Hemos dichos que $\Delta G'^{\circ}$ es una forma de expresar la constante de equilibrio de una reacción. Para la reacción (1) anterior,

$$K'_{eq_1} = \frac{\text{glucosa 6-fosfato}}{[\text{glucosa}]\,[P_i]} = 3.9 \times 10^{-3}\ \text{M}^{-1}$$

Obsérvese que no se incluye el H_2O en esta expresión ya que se considera que su concentración (55,5 M) permanece invariable durante la reacción. La constante de equilibrio para la hidrólisis del ATP es

$$K'_{eq_2} = \frac{[\text{ADP}]\,[P_i]}{[\text{ATP}]} = 2.0 \times 10^{5}\ \text{M}$$

La constante de equilibrio para las dos reacciones acopladas es

$$K'_{eq_3} = \frac{\text{glucosa 6-fosfato}\quad[\text{ADP}][P_i]}{\text{glucosa}\,[P_i][\text{ATP}]}$$
$$= (K'_{eq_1})(K'_{eq_2}) = (3.9 \times 10^{-3}\ \text{M}^{-1})(2.0 \times 10^{5}\ \text{M})$$
$$= 7.8 \times 10^{2}$$

Este cálculo ilustra un aspecto importante acerca de las constantes de equilibrio: aunque los valores de $\Delta G'^{\circ}$ para las dos reacciones que se suman en una tercera son *aditivas*, la K'_{eq} para una reacción que es la suma de otras dos reacciones es el *producto* de los valores de K'_{eq} individuales. Las constantes de equilibrio son *multiplicativas*. Gracias al acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la síntesis de la glucosa 6-fosfato, la K'_{eq} para la formación de glucosa 6-fosfato ha aumentado en un factor de 2×10^5.

Esta estrategia del intermedio común es empleada por todas las células vivas en la síntesis de intermedios metabólicos y componentes celulares. Obviamente, la estrategia sólo funciona cuando se dispone de compuestos tales como el ATP de forma continua. En los siguientes capítulos consideraremos varias de las rutas celulares más importantes para la producción de ATP. Para una mayor práctica en la utilización de cambios de energías libre y constantes de equilibrio para reacciones acopladas, vea los ejemplos prácticos en el Capítulo 1 (pp. 25-27).

RESUMEN 13.1 Bioenergética y termodinámica

- Las células vivas realizan trabajo constantemente. Necesitan energía para mantener sus estructuras altamente organizadas, sintetizar los componentes celulares, transportar iones y pequeñas moléculas a través de las membranas y generar corrientes eléctricas.
- La bioenergética es el estudio cuantitativo de las relaciones energéticas y las conversiones de energía en los sistemas biológicos. Las transformaciones de energía biológicas obedecen las leyes de la termodinámica.
- Todas las reacciones químicas están influidas por dos fuerzas: la tendencia a adquirir el estado de enlace más estable (para el que la entalpía H, es una expresión útil) y la tendencia a conseguir el mayor grado de desorden, expresada como entropía, S. La fuerza impulsora neta en una reacción es ΔG, la variación de energía libre, que representa el efecto neto de estos dos factores: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$.
- La variación de energía libre estándar transformada, $\Delta G'^{\circ}$, es una constante física característica de una reacción dada que puede calcularse a partir de la constante de equilibrio para la reacción: $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$.
- La variación de energía libre real, ΔG, es una variable que depende de $\Delta G'^{\circ}$ y de las concentraciones de reactivos y productos: $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([\text{productos}]/[\text{reactivos}])$.
- Cuando ΔG es grande y negativa, la reacción tiende a discurrir en el sentido directo; cuando ΔG es grande y positiva, la reacción tiende a ir en la dirección opuesta; y cuando $\Delta G = 0$, el sistema está en el equilibrio.
- La variación de energía libre de una reacción es independiente de la ruta por la que transcurre la reacción. Las variaciones de energía libre son aditivas; la reacción química neta que resulta de dos reacciones sucesivas que comparten un intermedio común tiene una variación de energía libre global que es la suma de los valores de ΔG de las reacciones individuales.

13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes

Las transducciones biológicas de energía que nos interesan aquí son reacciones químicas. La química celular no abarca todas las clases de reacciones que se aprenden en un curso típico de química orgánica. Las reacciones que tienen lugar en los sistemas biológicos así como las que no tienen lugar vienen dadas (1) por su importancia para el sistema biológico concreto y (2) sus velocidades. Las dos consideraciones juegan papeles importantes en la forma adquirida por las rutas metabólicas que consideraremos a lo largo de lo que queda del libro. Una reacción pertinente es la que utiliza un sustrato disponible y lo convierte en un producto útil. No obstante, incluso una reacción potencialmente pertinente puede que no tenga lugar. Algunas transformaciones químicas son demasiado lentas (tienen energías de activación demasiado elevadas) para contribuir a los sistemas vivientes incluso con la ayuda de catalizadores enzimáticos poderosos. Las reacciones que sí tienen lugar en la célula representan una caja de herramientas que ha utilizado la evolución para construir las rutas metabólicas que evitan las reacciones "imposibles".

Saber reconocer las reacciones plausibles puede ser de gran ayuda para desarrollar un buen dominio de la bioquímica.

Aun así, el número de transformaciones metabólicas que tienen lugar en una célula típica puede parecer abrumador. La mayoría de células tienen la capacidad para llevar a cabo miles de reacciones específicas catalizadas por enzimas: por ejemplo, la transformación de un nutriente sencillo tal como la glucosa en aminoácidos, nucleótidos o lípidos; la extracción de energía a partir de combustibles mediante su oxidación o la polimerización de subunidades monoméricas en macromoléculas.

Para estudiar estas reacciones es esencial una cierta organización. Existen patrones dentro de la química de la vida; no es necesario aprender cada una de estas reacciones para aprehender la lógica molecular de la bioquímica. La mayoría de reacciones de las células vivas se encuadran en cinco categorías generales: (1) reacciones que forman o rompen enlaces carbono-carbono; (2) reordenamientos internos, isomerizaciones y eliminaciones; (3) reacciones de radicales libres; (4) transferencias de grupo y (5) óxido-reducciones. A continuación discutiremos cada una de éstas en mayor detalle y nos referiremos a ejemplos de cada tipo que se estudian en capítulos posteriores. Observe que los cinco tipos de reacciones no son mutuamente excluyentes; por ejemplo, una reacción de isomerización puede transcurrir a través de un intermedio radical libre.

Sin embargo, antes de continuar deberíamos considerar dos principios químicos básicos. Primero, un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido y, en general, el enlace se puede partir de dos formas **(Fig. 13-1)**. En la **rotura homolítica**, cada átomo abandona el enlace en forma de **radical**, llevando un electrón desapareado. En la **rotura heterolítica**, la más frecuente, un átomo retiene los dos electrones de enlace. En la Figura 13-1 se muestran las especies generadas más frecuentemente al romper enlaces C-C y C-H. Los carbaniones, carbocationes e iones hidruro son muy inestables; esta inestabilidad conforma la química de estos iones tal como veremos más adelante.

El segundo principio básico es que en muchas reacciones bioquímicas intervienen interacciones entre **nucleófilos** (grupos funcionales ricos en electrones con capacidad para cederlos) y **electrófilos** (grupos funcionales con una carencia de electrones y ávidos de los mismos). Los nucleófilos se combinan con los electrófilos a los que ceden sus electrones. En la **Figura 13-2** se da una lista de nucleófilos y electrófilos comunes. Obsérvese que un átomo de carbono puede actuar como nucleófilo o como electrófilo según sean los enlaces y grupos funcionales que lo rodean.

Reacciones que forman o rompen enlaces carbono-carbono La rotura heterolítica de un enlace C–C forma un **carbanión** y un **carbocatión** (Fig. 13-1). Y a la inversa, la formación de un enlace C–C implica la combinación de un carbanión nucleofílico con un carbocatión elec-

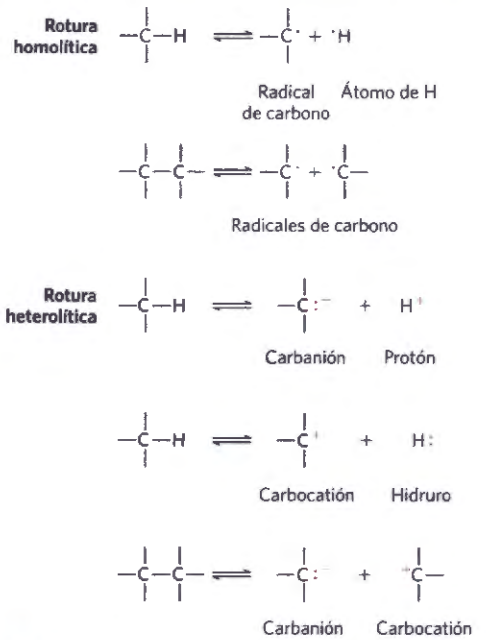


FIGURA 13-1 Dos mecanismos para la rotura de un enlace C-C o C-H. En una rotura homolítica, cada átomo de carbono mantiene uno de los electrones de enlace, formándose radicales carbono (carbonos con electrones desapareados) o átomos de hidrógeno sin carga. En las roturas heterolíticas, uno de los átomos mantiene los dos electrones enlazantes. Esto puede dar lugar a la formación de carbaniones, carbocationes, protones o iones hidruro.

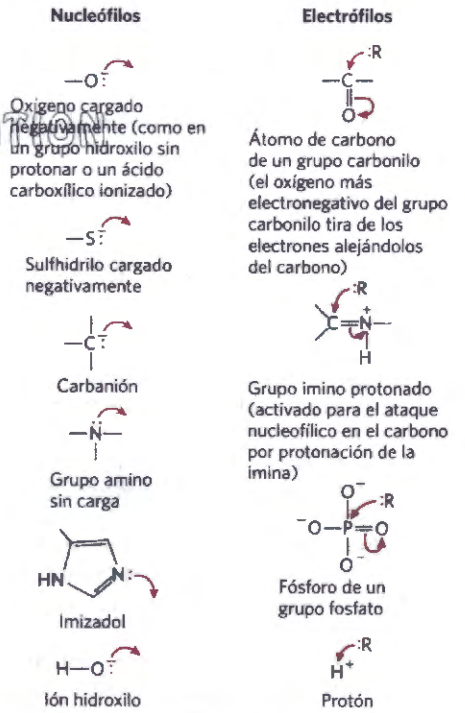


FIGURA 13-2 Nucleófilos y electrófilos comunes en reacciones bioquímicas. Los mecanismos químicos de reacción, que siguen la formación y rotura de enlaces covalentes, están comunicados por puntos o flechas curvas, una convención conocida informalmente como "empujón electrónico" o desplazamiento electrónico. Un enlace covalente consiste en un par de electrones compartido. Los electrones no enlazados que son importantes para el mecanismo de reacción se muestran con puntos (:). Las flechas curvas (↷) representan el desplazamiento de pares de electrones. Para el desplazamiento de un solo electrón (como en una reacción de radical libre), se utiliza una flecha con una sola punta en la cabeza (tipo anzuelo) (↶). En la mayoría de pasos en una reacción interviene un par electrónico no compartido.

trofílico. En general, los carbaniones y carbocationes son tan inestables que su formación como intermedios de reacción puede ser inaccesible energéticamente, incluso con catalizadores enzimáticos. Para el propósito de la bioquímica celular son reacciones imposibles, a menos que se les proporcione asistencia química en forma de grupos funcionales que contengan átomos electronegativos (O y N) que puedan alterar la estructura electrónica de átomos de carbono adyacentes de tal modo que se estabilice y facilite la formación de intermedios carbanión y carbocatión.

Los grupos carbonilo son especialmente importantes en las transformaciones químicas de las rutas metabólicas. El carbono de un grupo carbonilo tiene una carga positiva parcial debido a la propiedad eliminadora de electrones por parte del oxígeno carbonílico, por lo que es un carbono electrofílico **(Fig. 13-3a)**. La presencia de un grupo carbonilo puede así facilitar la formación de un carbanión en un carbono adyacente al deslocalizar la carga negativa del carbanión (Fig. 13-3b). Un grupo imino (véase la Fig. 1-17) puede realizar una función similar (Fig. 13-3c). La capacidad de los grupos carbonilo e imino para deslocalizar eletrones se puede potenciar aún más por acción de un catalizador ácido o por un ión metálico tal como Mg^{2+} (Fig. 13-3d).

La importancia de un grupo carbonilo es evidente en tres clases importantes de reacciones en las que se forman o rompen enlaces C–C **(Fig. 13-4)**: condenaciones aldólicas, condensaciones de ésteres de Claisen y descarboxilaciones. En cada tipo de reacción, se estabiliza un intermedio carbanión por un grupo carbonilo y, en muchos casos, otro carbonilo proporciona el electrófilo con el que reacciona el carbanión nucleofílico.

Una **condensación aldólica** es una ruta común para la formación de un enlace C-C; la reacción de la aldolasa, que convierte un compuesto de seis carbonos en dos de tres carbonos en la glucólisis es una condensación aldólica en el sentido inverso (véase la Fig. 14-6). En una **condensación de Claisen**, el carbonilo de un tioéster adyacente estabiliza el carbanión; un ejemplo es la síntesis de citrato en el ciclo del ácido

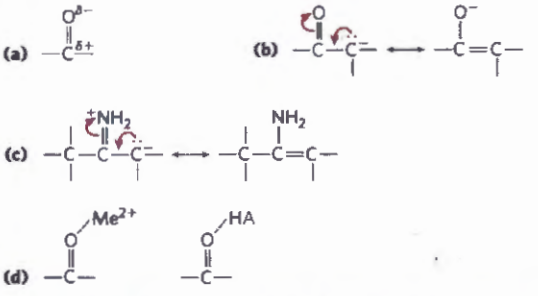


FIGURA 13-3 Propiedades químicas de los grupos carbonilo. **(a)** El átomo de carbono de un grupo carbonilo es un electrófilo debido a la capacidad de retirar electrones del átomo de oxígeno electronegativo, lo que da lugar a una estructura en la que el carbono tiene una carga positiva parcial. **(b)** Dentro de una molécula, la deslocalización de electrones a un grupo carbonilo estabiliza un carbanión en un carbono adyacente, facilitando su formación. **(c)** Las iminas funcionan de una manera muy semejante a los grupos carbonilo facilitando la captación de electrones. **(d)** Los grupos carbonilo no siempre funcionan solos; su capacidad como sumideros de electrones a menudo se aumenta por interacción con un ión metálico (Me^{2+}, tal como Mg^{2+}) o un ácido general (HA).

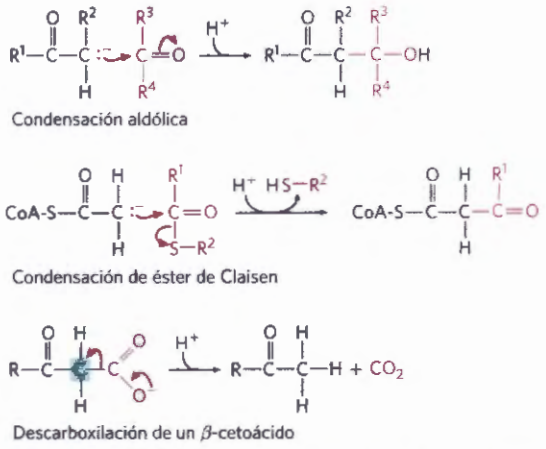


FIGURA 13-4 Algunas reacciones comunes que forman y rompen enlaces C-C en sistemas biológicos. Tanto en la condensación aldólica como en la condensación de Claisen, un carbanión actúa como nucleófilo mientras que el carbono de un grupo carbonilo actúa como electrófilo. El carbanión está estabilizado en cada caso por otro carbonilo en el carbono adyacente. En la reacción de descarboxilación, se forma un carbanión sobre el carbono sombreado en azul al tiempo que sale el CO_2. La reacción no transcurriría a velocidad apreciable sin el efecto estabilizador del carbonilo adyacente al carbono del carbanión. Dondequiera que se muestra un carbanión, se supone una resonancia estabilizadora con el carbonilo adyacente, tal como se muestra en la Figura 13-3b). Una imina (Fig. 13-3c) u otro grupo captador de electrones (incluidos ciertos cofactores enzimáticos tales como el piridoxal) puede reemplazar el grupo carbonilo en la estabilización de carbaniones.

COPYRIGHTED

cítrico (véase la Fig. 16-9). La descarboxilación también transcurre normalmente a través de la formación de un carbanión estabilizado por un grupo carbonilo; un ejemplo lo constituye la reacción de la acetoacetato descarboxilasa que tiene lugar en la formación de cuerpos cetónicos durante el catabolismo de los ácidos grasos (véase la Fig. 17-18). Rutas metabólicas enteras están organizadas alrededor de la introducción de un grupo carbonilo en una localización especial de manera que un enlace carbono-carbono próximo pueda formarse o romperse. En algunas reacciones, una imina o un cofactor tal como el piridoxal fosfato juegan el papel de eliminador de electrones del grupo carbonilo.

El intermedio carbocatión que se produce en algunas reacciones que forman o rompen enlaces C-C se genera por eliminación de un grupo saliente excelente tal como el pirofosfato (véase más adelante las reacciones de transferencia de grupo). Un ejemplo es la reacción de la preniltransferasa **(Fig. 13-5)**, en una etapa temprana de la ruta de biosíntesis del colesterol.

Reorganizaciones internas, isomerizaciones y eliminaciones Otra clase común de reacciones que se dan en las células son las reorganizaciones intramoleculares en las que la redistribución de electrones provoca alteraciones de muchos tipos diferentes sin que cambie el estado de oxidación global de la molécula. Por ejemplo, diferentes grupos de una molécula pueden experimentar oxidación-reducción sin cambio neto en el estado de oxidación de la molécula; grupos en un doble enlace pueden experimentar un reordenamiento cis-trans o se pueden trasponer las posiciones de los dobles enlaces. Un ejemplo de isomerización que acarrea oxidación-reducción es la for-

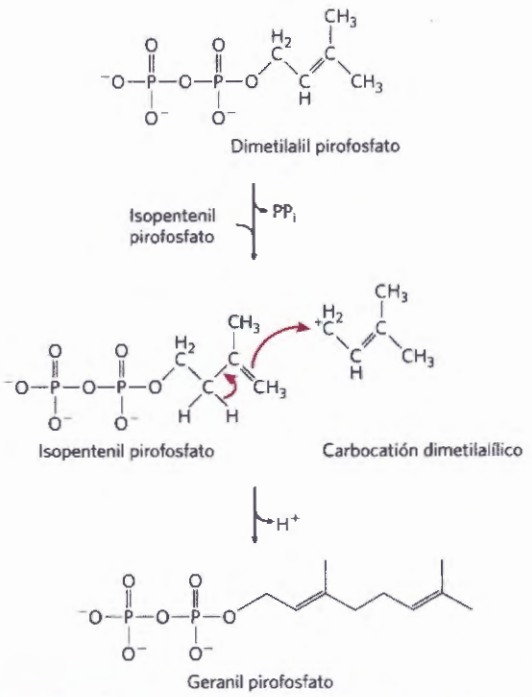
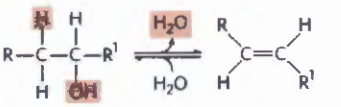


FIGURA 13-5 Carbocationes en la formación de enlaces carbono-carbono. En una de las primeras etapas de la biosíntesis del colesterol, el enzima prenil transferasa cataliza la condensación del isopentenil pirofosfato con el dimetilalil pirofosfato para formar geranil pirofosfato (véase la Fig. 21-36). La reacción se inicia con la eliminación de pirofosfato del dimetilalil pirofosfato generando un carbocatión estabilizado por resonancia con el enlace C=C adyacente.

mación de fructosa 6-fosfato a partir de la glucosa 6-fosfato en la glucólisis (**Fig. 13-6**; esta reacción se discute en detalle en el Capítulo 14): el C-1 se reduce (de aldehído a alcohol) y el C-2 se oxida (de alcohol a cetona). En la figura 13-6b se muestran los detalles de los movimientos de electrones en este tipo de isomerización. Un reordenamiento cis-trans típico es el de la reacción de la prolil cis-trans isomerasa en el plegamiento de ciertas proteínas (véase la Fig. 4-8). Se produce una simple transposición de un enlace C=C durante el metabolismo de un ácido graso común tal como el ácido oleico (véase la Fig. 17-10); más adelante veremos ejemplos espectaculares de resituación del doble enlace en la síntesis del colesterol (véase la Fig. 21-33).

Un ejemplo de reacción de eliminación que no afecta el estado de oxidación global es la pérdida de agua de un alcohol que introduce un enlace C=C



Reacciones similares pueden tener lugar en las eliminaciones en aminas.

Reacciones de radicales libres Aunque hace un tiempo se creía que era rara, se ha encontrado actualmente que la rotura homolítica de enlaces covalentes con generación de radicales libres se da en muchos procesos bioquímicos. Entre ellos se encuentran las isomerizaciones que utilizan la adenosilcobalamina (vitamina B_{12}) o la *S*-adenosilmetionina, que se inician con un radical 5'-desoxiadenosilo (véase la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa en el Recuadro 17-2); ciertas reacciones de descarboxilación iniciadas por radicales (**Fig. 13-7**); algunas reacciones de reductasas tales como la catalizada por la ribonucleótido reductasa (véase la Fig. 22-42) y algunos reordenamientos tales como el catalizado por la DNA fotoliasa (véase la Fig. 25-26).

COPYSTATION

Reacciones de transferencia de grupo La transferencia de grupos acilo, glucosilo y fosforilo desde un nucleófilo a otro es frecuente en las células vivas. En la transferencia de grupos acilo interviene generalmente la adición de un nucleófilo al carbono carbonílico de un grupo acilo para formar un intermedio tetraédrico.



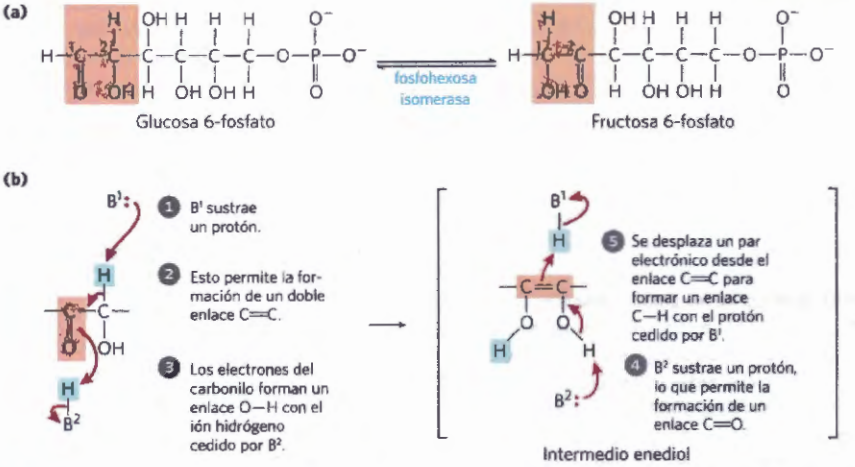


FIGURA 13-6 Reacciones de isomerización y eliminación. (a) La conversión de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato, una reacción del metabolismo de los azúcares catalizada por la fosfohexosa isomerasa. **(b)** Esta reacción tiene lugar a través de un intermedio enediol. Los recuadros rosa siguen la ruta de oxidación de izquierda a derecha. B^1 y B^2 son grupos ionizables del enzima; pueden dar y aceptar protones (actuando como ácidos generales o bases generales) mientras transcurre la reacción.

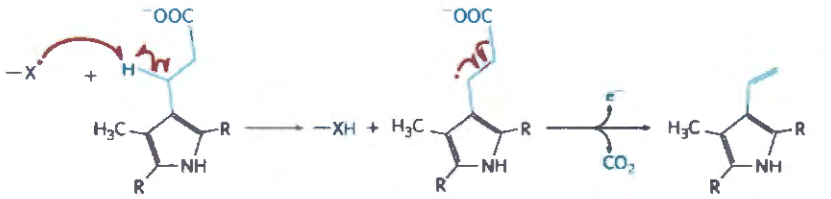


FIGURA 13-7 Reacción de descarboxilación iniciada por un radical libre. La biosíntesis del hemo (véase la Fig. 22-26) en *Escherichia coli* incluye un paso de descarboxilación en el que las cadenas laterales propionilo en el intermedio coproporfirinógeno III se convierten en las cadenas laterales vinilo del protoforinógeno IX. Cuando se hace crecer las bacterias de manera anaeróbica, el enzima coproporfirinógeno III oxidasa independiente de oxígeno, también llamado proteína HemN, provoca la descarboxilación vía el mecanismo de radical libre que se muestra aquí. No se conoce el aceptor del electrón liberado. Por razones de simplicidad, sólo se muestran las porciones pertinentes de las grandes moléculas de coproporfirinógeno III y protoporfirinógeno; las estructuras completas se muestran en la Figura 22-26. Cuando *E. coli* crece en presencia de oxígeno, esta reacción es una descarboxilación oxidativa y es catalizada por un enzima diferente.[Fuente: Información de G. Layer et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:468, 2004, Fig. 4.]

La reacción de la quimotripsina es un ejemplo de transferencia de grupo acilo (véase la Fig. 6-23). Las transferencias de glucosilo implican la sustitución nucleofílica en el C-1 de un anillo de azúcar el cual es el átomo central de un acetal. En principio, la sustitución podría tener lugar vía S_N1 o S_N2, tal como se describe en la Figura 6-29 para el enzima lisozima.

Las transferencias de grupos fosforilo juega un papel especial en las rutas metabólicas; estas reacciones de transferencia se discuten detalladamente en la Sección 13.3. Un tema general en el metabolismo es la unión de un buen grupo saliente a un intermediario metabólico, para "activar" este intermediario de cara a reacciones posteriores. Entre los mejores grupos salientes para reacciones de sustitución nucleofílica están el ortofosfato inorgánico (la forma ionizada, a pH neutro del H_3PO_4, consistente en una mezcla de H_2PO^{4-} y HPO_4^{2-}, abreviado normalmente como P_i) y el pirofosfato inorgánico ($P_2O_7^{4-}$, abreviado PP_i); los ésteres y anhídridos del ácido fosfórico están activados de manera efectiva para la reacción. La sustitución nucleofílica resulta más favorable mediante la unión de un grupo fosforilo a un grupo saliente, como por ejemplo el –OH, que de otro modo sería muy pobre. Las sustituciones nucleofílicas en las que el grupo fosforilo ($-PO_3^{2-}$) actúa como grupo saliente, tienen lugar en centenares de reacciones metabólicas.

El fósforo puede formar cinco enlaces covalentes. La representación convencional del P_i **(Fig. 13-8a)** con tres enlaces P-O y uno P=O, es una representación útil pero no muy precisa. En el P_i hay cuatro enlaces fósforo-oxígeno equivalentes que comparten cierto carácter de doble enlace, y el anión tiene una estructura tetraédrica (Fig. 13-8b). Como el oxígeno es más electronegativo que el fósforo, el reparto de electrones no es equitativo: el fósforo central tiene una carga positiva parcial, pudiendo actuar, por tanto, como un electrófilo. En gran número de reacciones metabólicas se transfiere un grupo fosforilo ($-PO_3^{2-}$) desde el ATP a un alcohol, formando un éster fosfato (Fig. 13-8c) o a un ácido carboxílico formando un anhídrido mixto. Cuando un nucleófilo ataca el átomo de fósforo electrofílico del ATP, se forma un intermedio con estructura pentacovalente relativamente estable (Fig. 13-8d). Con la marcha del grupo saliente (ADP), se completa la transferencia

COPYSTATION

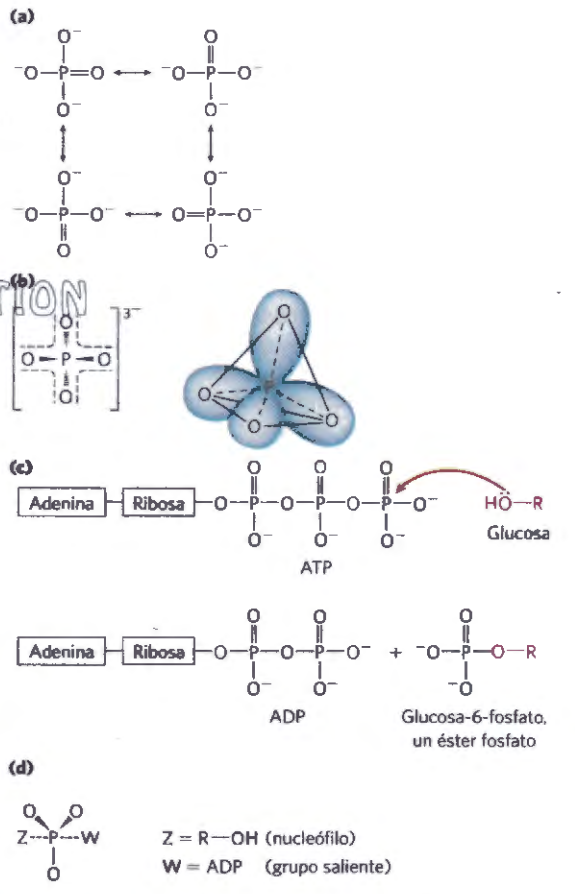


FIGURA 13-8 Transferencias de grupos fosforilo: algunos de los participantes. (a) En una representación (inadecuada) del P_i hay tres oxígenos unidos por enlace sencillo al fósforo y un cuarto mediante un doble enlace, permitiendo las cuatro estructuras de resonancia diferentes que se muestran. **(b)** Las estructuras de resonancia del P_i pueden ser representadas de una manera más precisa mostrando los cuatro enlaces fósforo-oxígeno con cierto carácter de doble enlace; los orbitales híbridos así representados se estructuran en un tetraedro con el P en su centro. **(c)** Cuando un nucleófilo Z (en este caso, el -OH del C-6 de la glucosa) ataca al ATP, desplaza al ADP (W). En esta reacción S_N2 se forma un intermedio pentacovalente transitorio **(d)**.

del grupo fosforilo. La gran familia de enzimas que catalizan transferencias de grupo fosforilo en las que se utiliza el ATP como dador se denominan quinasas (del griego *kinein*, "mover"). La hexoquinasa, por ejemplo, "mueve" un grupo fosforilo del ATP a la glucosa.

Los grupos fosforilo no son los únicos grupos que activan moléculas para la reacción. Los tioalcoholes (tioles), en los que se sustituye el átomo de oxígeno de un alcohol por un átomo de azufre, también son buenos grupos salientes. Los tioles activan los ácidos carboxílicos formando tioésteres (ésteres tiólicos). Encontraremos en capítulos posteriores diversas reacciones, incluidas las catalizadas por las ácido graso sintasas en la síntesis de lípidos (véase la Fig. 21-2), en las que la sustitución nucleofílica en el carbono carbonílico de un tioéster tiene como resultado la transferencia del grupo acilo a otra porción de una molécula.

Reacciones de oxidación-reducción Los átomos de carbono pueden existir en cinco estados de oxidación, dependiendo de los elementos con los que compartan electrones **(Fig. 13-9)**, y las transiciones entre estos estados son de importancia crucial en el metabolismo (las reacciones de oxidación-reducción son el objeto de la Sección 13.4). En muchas oxidaciones biológicas un compuesto pierde dos electrones y dos iones hidrógeno (es decir, dos átomos de hidrógeno); estas reacciones son llamadas generalmente deshidrogenaciones y los enzimas que las catalizan son las deshidrogenasas **(Fig. 13-10)**. En algunas oxidaciones biológicas, aunque no en todas, un átomo de carbono pasa a unirse covalentemente a un átomo de oxígeno. Los enzimas que catalizan estas oxidaciones suelen llamarse oxidasas o, si el átomo de oxígeno proviene directamente del oxígeno molecular (O_2), oxigenasas.

Cada oxidación debe ir acompañada de una reducción, en la que un aceptor electrónico adquiere los electrones eliminados por la oxidación. Las reacciones de oxidación suelen liberar energía (piénsese en los fuegos de campamento: los compuestos de la madera son oxidados por las moléculas de oxígeno del aire). La mayor parte de las células obtienen la energía necesaria para su trabajo celular mediante la oxidación de combustibles metabólicos tales como glúcidos o grasas (los organismos fotosintéticos también pueden captar y utilizar la energía de la luz solar). Las rutas catabólicas (productoras de energía) descritas en los capítulos 14 a 19 son secuencias de reacciones oxidativas que conducen a la transferencia de electrones de las moléculas de combustible, a través de una serie de transportadores de electrones, hasta el oxígeno. La alta afinidad del O_2 por los electrones hace que el conjunto del proceso de transferencia de electrones sea altamente exergónico, suministrando la energía que impulsa la síntesis de ATP, objetivo central del catabolismo.

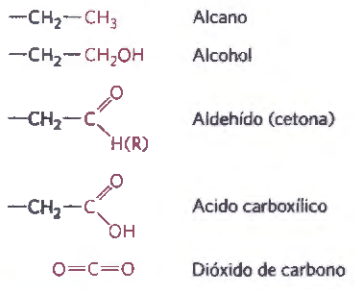


FIGURA 13-9 Estados de oxidación del carbono en las biomoléculas. Cada compuesto se forma por oxidación del carbono marcado en rojo del compuesto inmediatamente superior. El dióxido de carbono es la forma más oxidada de carbono presente en los seres vivos.

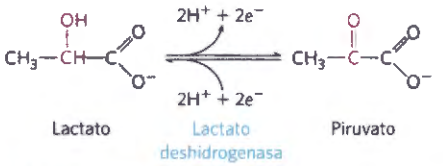


FIGURA 13-10 Una reacción de oxidación-reducción. Aquí se muestra la oxidación del lactato a piruvato. En esta deshidrogenación, dos electrones y dos iones hidrógeno (el equivalente a dos átomos de hidrógeno) se eliminan del C-2 del lactato, un alcohol, para formar piruvato, una cetona. En las células esta reacción está catalizada por la lactato deshidrogenasa y los electrones se transfieren al cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta reacción es completamente reversible; el piruvato puede ser reducido por electrones transferidos desde el cofactor.

Muchas de las reacciones de estas cinco clases están facilitadas por cofactores, en la forma de coenzimas y metales (vitamina B_{12}, *S*-adenosilmetionina, folato, nicotinamida así como el hierro constituyen algunos ejemplos). Los cofactores se unen a los enzimas –en algunos casos reversiblemente, en otros de forma casi irreversible- confiriéndoles la capacidad de promover una clase determinada de química. La mayoría de cofactores participan en una gama restringida de reacciones muy relacionadas. En los capítulos siguientes, presentaremos y discutiremos cada cofactor importante en el punto en el que lo encontremos por primera vez. Los cofactores proporcionan otra forma de organizar el estudio de los procesos bioquímicos, ya que las reacciones favorecidas por un cofactor determinado están, generalmente, relacionadas mecanísticamente.

COPYSTATION

Las ecuaciones bioquímicas y químicas no son idénticas

Los bioquímicos escriben las ecuaciones metabólicas de forma simplificada, cosa que es especialmente evidente en las reacciones en las que interviene el ATP. Los compuestos fosforilados pueden existir en diversos estados de ionización y, tal como ya hemos señalado, las diferentes especies pueden unir Mg^{2+}. Por ejemplo, a pH 7,0 y Mg^{2+} 2 mM, el ATP puede existir en las formas ATP^{4-}, $HATP^{3-}$, H_2ATP^{2-}, $MgHATP^-$ y Mg_2ATP. Sin embargo, al pensar acerca del papel biológico del ATP no siempre estamos interesados en todo este detalle por lo que consideramos el ATP como una entidad constituida por una suma de especies por lo que escribimos su hidrólisis con la ecuación bioquímica

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i$$

en donde ATP, ADP y P_i son sumas de especies. La correspondiente constante de equilibrio estándar transformada $K'_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$, depende del pH y del Mg^{2+} libre. Observe que H^+ y Mg^{2+} no aparecen en la ecuación bioquímica porque se mantienen constantes. Así, una reacción bioquímica no equilibra necesaria-

mente H, Mg o carga aunque equilibra todos los demás elementos que intervienen en la reacción (C, N, O y P, en la anterior ecuación).

Podemos escribir una reacción que *sí* equilibra todos los elementos y la carga. Por ejemplo, cuando se hidroliza el ATP a un pH superior a 8,5 en ausencia de Mg^{2+}, la reacción química se representa así

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

La constante de equilibrio correspondiente $K'_{eq} = [ADP^{3-}][HPO_4^{2-}][H^+]/[ATP^{4-}]$, depende sólo de la temperatura, presión y fuerza iónica.

Las dos formas de escribir una reacción metabólica son valiosas en bioquímica. Las ecuaciones químicas son necesarias cuando se ha de dar cuenta de todos los átomos y cargas en una reacción, como cuando consideramos el mecanismo de una reacción química. Se utilizan las ecuaciones bioquímicas para determinar la dirección en la que transcurrirá espontáneamente una reacción, dado un pH y una $[Mg^{2+}]$ determinados, o para calcular la constante de equilibrio de tal reacción.

A lo largo de este libro utilizaremos ecuaciones bioquímicas a menos que el foco esté puesto sobre un mecanismo químico y utilizaremos los valores de $\Delta G'^{\circ}$ y K'_{eq} determinados a pH 7 y Mg^{2+} 1mM.

RESUMEN 13.2 Lógica química y reacciones bioquímicas comunes

- Los sistemas vivos utilizan un gran número de reacciones químicas que se pueden clasificar en cinco tipos generales.
- Los grupos carbonilo juegan un papel especial en reacciones que forman o rompen enlaces C-C. Los intermedios carbanión son frecuentes y se estabilizan mediante grupos carbonilo adyacentes o, menos frecuentemente, por iminas o ciertos cofactores.
- Una redistribución de electrones puede producir reordenamientos, isomerizaciones y eliminaciones. Tales reacciones incluyen óxido-reducciones intramoleculares, cambios cis-trans en el ordenamiento de un doble enlace y trasposiciones de dobles enlaces.
- La rotura homolítica de enlaces covalentes que genera radicales libres tiene lugar en algunas rutas, tales como ciertas reacciones de isomerización, descarboxilación, de reductasas y reordenamientos.
- Las reacciones de transferencia de fosforilo son un tipo muy importante en la transferencia de grupo dentro de las células y se requieren para la activación de moléculas que han de intervenir en reacciones que, de otro modo, serían muy desfavorables.
- Las reacciones de oxidación-reducción implican la pérdida o ganancia de electrones: un reactivo gana electrones reduciéndose mientras que el otro los pierde y se oxida. Las reacciones de oxidación generalmente liberan energía siendo importantes en el catabolismo.

13.3 Transferencia de grupos fosforilo y ATP

Una vez desarrollados algunos principios fundamentales de los cambios de energía en los sistemas químicos y revisadas las clases comunes de reacciones podemos examinar ahora el ciclo de la energía en las células y el papel especial del ATP como la moneda energética que enlaza catabolismo y anabolismo (véase la Fig. 1-30). Las células heterotróficas obtienen energía libre en una forma química a través del catabolismo de moléculas nutrientes, y utilizan esta energía para producir ATP a partir de ADP y P_i. A continuación el ATP cede parte de su energía química a procesos endergónicos tales como la síntesis de intermediarios metabólicos y macromoléculas a partir de precursores más pequeños, el transporte de sustancias a través de membranas contra gradientes de concentración, y el movimiento mecánico. Esta cesión de energía a partir del ATP generalmente implica la participación covalente del ATP en la reacción que ha de ser impulsada, con el resultado final de que el ATP se convierte en ADP y P_i o, en algunas reacciones en AMP y 2 P_i. Discutiremos ahora la base química de laa grandes variaciones de energía libre que acompañan la hidrólisis del ATP y otros compuestos fosfato de alta energía, y mostraremos que en la mayoría de casos de cesión de energía por el ATP interviene una transferencia de grupo y no simplemente la bidrólisis del ATP. Para ilustrar la gama de transducciones de energía en las que el ATP proporciona la energía, consideraremos la síntesis de macromoléculas ricas en información, el transporte de solutos a través de membranas y el movimiento producido por la contracción muscular.

La variación de energía libre en la hidrólisis del ATP es grande y negativa

La **Figura 13-11** resume la base química de la relativamente grande y negativa variación de energía libre estándar de hidrólisis del ATP. La rotura hidrolítica del enlace anhídrido ácido fosfórico terminal (fosfoanhídrido) del ATP elimina uno de los tres fosfatos cargados negativamente con lo que disminuye parte de la repulsión electrostática del ATP; el P_i liberado está estabilizado por la formación de varias formas resonantes que no son posibles en el ATP.

La variación de energía libre para la hidrólisis del ATP es -30,5 kJ/mol en condiciones estándar, pero la energía libre *real* de hidrólisis (ΔG) del ATP en las células vivas es muy diferente: las concentraciones celulares de ATP, ADP y P_i no son idénticas y son mucho menores que las concentraciones estándar 1,0 M (Tabla 13-5). Además, el Mg^{2+} del citosol se une al ATP y al ADP **(Fig. 13-12)**, y en la mayoría de reacciones enzimáticas en las que interviene el ATP como dador de grupo fosforilo, el verdadero sustrato es $MgATP^{2-}$. La $\Delta G'^{\circ}$ pertinente es, por tanto, la de la hidrólisis del $MgATP^{2-}$. Puede calcularse la ΔG para la hidrólisis del ATP a partir de los datos de la Tabla 13-5. La energía libre de hidrólisis *real* del ATP en las condiciones intracelulares se la llama a menudo **potencial de fosforilación, ΔG_p**.

Se puede calcular la variación de energía libre real de cualquier reacción metabólica tal como tiene lugar en la célula, siempre que se conozcan las concentraciones de todos los reactivos y productos así como otros factores (tales como pH, temperatura yMg^{2+}] que puedan afectar a la variación de energía libre real.

Para complicar aun más la situación, las concentraciones *totales* de ATP, ADP, P_i (y H^+) en una célula

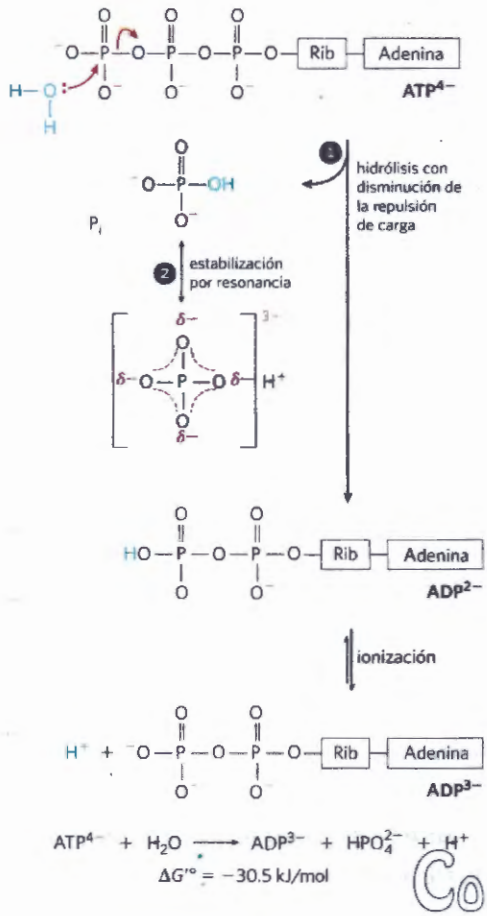


FIGURA 13-11 Base química de la elevada variación de energía libre asociada a la hidrólisis del ATP. ❶ La hidrólisis, al provocar la separación de cargas, elimina la repulsión electrostática entre las cuatro cargas negativas del ATP. ❷ El producto fosfato inorgánico (P_i) se estabiliza por la formación de un híbrido de resonancia, en el que cada uno de los cuatro enlaces fósforo-oxígeno tiene el mismo grado de carácter de doble enlace mientras que el ión hidrógeno no está asociado de manera permanente con ninguno de los oxígenos. (En los fosfatos involucrados en enlaces anhídrido o éster tiene lugar también un cierto grado de estabilización por resonancia, pero son posibles menos formas de resonancia que para el P_i). Un tercer factor (no mostrado) que favorece la hidrólisis del ATP es el mayor grado de solvatación (hidratación) de los productos P_i y ADP con relación al ATP, lo que estabiliza aún más los productos con relación a los reactivos.

–como las que se dan en la Tabla 13-5– pueden ser sustancialmente superiores a las concentraciones *libres*, que son los valores termodinámicamente pertinentes.

TABLA 13-5 Concentraciones totales de nucleótidos de adenina, fosfato inorgánico y fosfocreatina en algunas células

	Concentración (mM)[a]				
	ATP	ADP[b]	AMP	P_i	PCr
Hepatocito de rata	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Miocito de rata	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Neurona de rata	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Eritrocito humano	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Célula de *E. coli*	7,90	1,04	0,82	7,9	0

[a] En el caso de los eritrocitos las concentraciones son las del citosol (los eritrocitos humanos carecen de núcleo y mitocondrias). En los otros tipos de células los datos corresponden a los contenidos totales de la célula, aunque el citosol y la mitocondria tienen concentraciones muy diferentes de ADP. PCr es fosfocreatina, que se describe en la p. 516.

[b] Este valor refleja la concentración total; el verdadero valor para el ADP libre puede ser mucho menor.

La diferencia se debe a la fuerte unión de ATP, ADP y P_i a proteínas celulares. Por ejemplo, la [ADP] libre en el músculo en reposo se ha calculado de forma variada entre 1 y 37 μM. Utilizando el valor 25 μM en el Ejemplo práctico 13-2, obtendríamos una ΔG_p de -64 kJ/mol. No obstante, el cálculo del valor exacto de ΔG_p es, quizá, menos instructivo que la generalización que podemos hacer sobre los cambios de energía libre reales: in vivo, la energía liberada por la hidrólisis del ATP es mayor que el valor de la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^{\circ}$.

En las discusiones que siguen utilizaremos el valor de $\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del ATP, porque ello permite una comparación, sobre la misma base, con la energética de otras reacciones celulares. Recuerde, sin embargo, que en las células vivas la cantidad pertinente es ΔG -para la hidrólisis del ATP y cualquier otra reacción- y que puede ser bastante diferente de $\Delta G'^{\circ}$.

Aquí hemos de mencionar un punto importante sobre los niveles celulares de ATP. Hemos visto (y lo discutiremos aún más) que las propiedades químicas del ATP hacen que sea una forma adecuada de moneda energética en las células. Pero no son solamente las propiedades químicas intrínsecas que le confieren esta capacidad para impulsar reacciones metabólicas y otros procesos que requieren energía. Más importante aún es que, en el transcurso de la evolución ha habido una fuerte presión selectiva hacia mecanismos reguladores que *mantienen las concentraciones celulares de ATP muy por encima de las concentraciones de equilibrio* para la reacción de hidrólisis. Cuando bajan las concentraciones de ATP, no sólo disminuye la *cantidad*

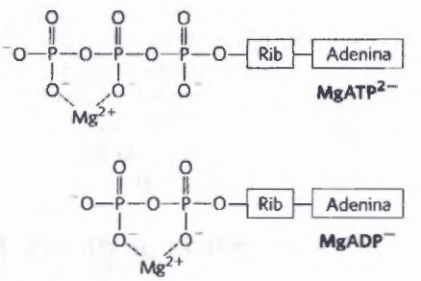


FIGURA 13-12 Mg^{2+} y ATP. La formación de los complejos con Mg^{2+} apantalla parcialmente las cargas negativas e influye sobre la conformación de los grupos fosfato de nucleótidos tales como el ATP y el ADP.

Copy-Station

EJEMPLO PRÁCTICO 13-2 Cálculo de ΔG_p

Calcule la energía libre real de hidrólisis de ATP, ΔG_p, en los eritrocitos humanos. La energía libre estándar de hidrólisis del ATP es de -30,5 kJ/mol, y las concentraciones de ATP, ADP y P_i en los eritrocitos son las que se muestran en la Tabla 13-5. Supongamos que el pH es 7,0 y la temperatura 37 °C (temperatura corporal). ¿Qué nos dice todo ello sobre la cantidad de energía requerida para *sintetizar* ATP en las mismas condiciones celulares?

Solución: CLas concentraciones de ATP, ADP y P_i en los eritrocitos humanos son 2,25, 0,25 y 1,65 mM, respectivamente. La energía libre real de hidrólisis del ATP en estas condiciones viene dada por la relación (véase la Ecn 13-4)

$$\Delta G_p = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]}$$

Sustituyendo por los valores adecuados obtenemos

$$\begin{aligned}\Delta G_p &= -30.5\ \text{kJ/mol} + \left[(8.315\ \text{kJ/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})\ \ln\frac{(0.25\times10^{-3})(1.65\times10^{-3})}{(2.25\times10^{-3})}\right] \\ &= -30.5\ \text{kJ/mol} + (2.58\ \text{kJ/mol})\ \ln 1.8\times10^{-4} \\ &= -30.5\ \text{kJ/mol} + (2.58\ \text{kJ/mol})(-8.6) \\ &= -30.5\ \text{kJ/mol} - 22\ \text{kJ/mol} \\ &= -52\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

(Observe que la respuesta final se ha redondeado al número correcto de cifras significativas (52,5 redondeado a 52), según las reglas de redondear 5 al número par más cercano para evitar el sesgo inherente al "redondeo"). Así, ΔGp, la variación de energía libre real para la hidrólisis del ATP en el eritrocito intacto (-52 kJ/mol), es mucho mayor que la variación de energía libre estándar (-30,5 kJ/mol). Por el mismo motivo, la energía libre requerida para *sintetizar* ATP a partir del ADP y P_i en las condiciones existentes en el eritrocito sería 52 kJ/mol.

COPYSTATION

de combustible, sino que el combustible *pierde su potencia*: ΔG para su hidrólisis (es decir, el potencial de fosforilación ΔG_p) disminuye. Tal como se verá en la discusión de las rutas metabólicas que producen y consumen ATP, las células vivas han desarrollado mecanismos elaborados, frecuentemente a expensas de lo que nos podría parecer eficiencia y sentido común, para mantener concentraciones elevadas de ATP.

Otros compuestos fosforilados y tioésteres también tienen energías libres de hidrólisis elevadas

El fosfoenolpiruvato (PEP; **Fig. 13-13**) contiene un enlace éster fosfato que puede ser hidrolizado dando la forma enol del piruvato, y este producto directo de hidrólisis puede tautomerizar inmediatamente a la forma ceto que es más estable. Debido a que el reactivo (PEP) sólo tiene una forma (enol) y que el producto (piruvato) tiene dos formas posibles, el producto está estabilizado en relación al reactivo. Éste es el factor que más contribuye a la elevada energía libre estándar de hidrólisis del fosfoenolpiruvato: $\Delta G'^\circ$ = -61,9 kJ/mol.

Otro compuesto de tres carbonos, el 1,3-bisfosfoglicerato **(Fig. 13-14)** contiene un enlace anhídrido entre el grupo carboxilo en C-1 y el ácido fosfórico. La hidrólisis de este acil fosfato va acompañada de un cambio grande y negativo de energía libre estándar ($\Delta G'^\circ$ = -49,3 kJ/mol), que también se puede explicar en función de la estructura de reactivo y productos. Cuando se añade H_2O al enlace anhídrido del 1,3-bisfosfoglicerato, uno de los productos directos, el ácido 3-fosfoglicérico, puede perder inmediatamente un protón para dar el ión carboxilato, 3-fosfoglicerato, que tiene dos formas de resonancia igualmente probables (Fig. 13-14). La eliminación del producto directo (ácido 3-fosfoglicérico) y la formación de un ión estabilizado por resonancia favorece la reacción directa.

En la fosfocreatina **(Fig. 13-15)**, el enlace P–N puede ser hidrolizado generando creatina libre y P_i. La liberación de P_i y la estabilización por resonancia de la creatina favorece la reacción directa. El cambio de energía libre estándar de la hidrólisis de la fosfocreatina es también grande, –43,0 kJ/mol.

En todas estas reacciones que liberan fosfato, las diferentes formas de resonancia posibles para el P_i (Fig.

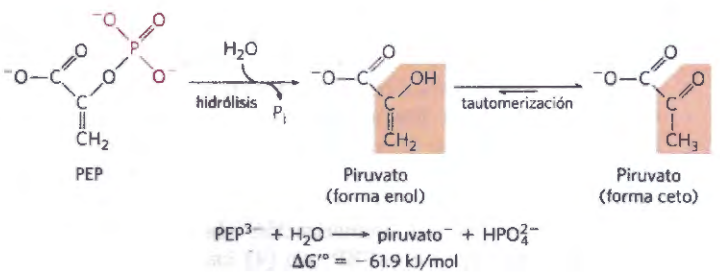
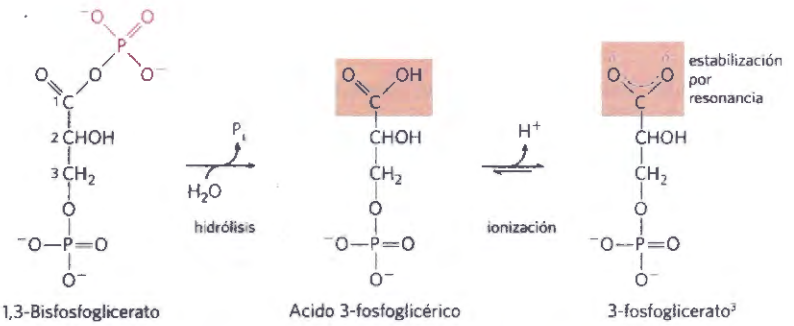
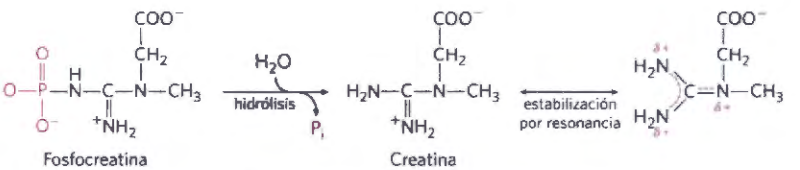


FIGURA 13-13 Hidrólisis del fosfoenolpiruvato (PEP). Esta reacción catalizada por la piruvato quinasa, va seguida de la tautomerización espontánea del producto, el piruvato. La tautomerización no es posible en el PEP, por lo que los productos de hidrólisis están estabilizados en relación a los reactivos. También tiene lugar la estabilización por resonancia del P_i, tal como se muestra en la Fig. 13-11.



1,3-Bisfosfoglicerato^{4-} + H_2O ⟶ 3-Fosfoglicerato^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+
$\Delta G'^{\circ} = -49.3$ kJ/mol

FIGURA 13-14 Hidrólisis del 1,3-bisfosfoglicerato. El producto directo de la hidrólisis es el ácido 3-fosfoglicérico, que posee un grupo ácido carboxílico sin disociar. Su disociación permite estructuras resonantes que estabilizan el producto con relación a los reactivos. La estabilización por resonancia del P_i también contribuye a la variación de energía libre negativa.



Fosfocreatina^{2-} + H_2O ⟶ creatina + HPO_4^{2-}
$\Delta G'^{\circ} = -43.0$ kJ/mol

FIGURA 13-15 Hidrólisis de la fosfocreatina. La rotura del enlace P-N de la fosfocreatina produce creatina, que está estabilizada por la formación de un híbrido de resonancia. El otro producto, P_i, ta mbién está estabilizado por resonancia.

13-11) estabilizan este producto en relación al reactivo, contribuyendo a un cambio de energía libre ya de por sí negativo. En la Tabla 13-6 se muestran las energías libres estándar de hidrólisis de diversos compuestos fosforilados biológicamente importantes.

Los **tioésteres**, en los que un átomo de azufre sustituye al oxígeno habitual en el enlace éster, tienen también energías libres estándar de hidrólisis grandes y negativas. El acetil-coenzima A, o acetil-CoA **(Fig. 13-16)**, es uno de los muchos tioésteres importantes en el metabolismo. El grupo acilo de estos compuestos se activa para reacciones de transacilación, condensación u oxidación-reducción. Los tioésteres experimentan una estabilización por resonancia mucho menor que la de los ésteres de oxígeno; en consecuencia, la diferencia en energía libre entre el reactivo y sus productos de hidrólisis, que *están* estabilizados por resonancia, es mayor para los tioésteres que para los ésteres de oxígeno comparables **(Fig. 13-17)**. En ambos casos, la hidrólisis del éster genera un ácido carboxílico, que se puede ionizar y adoptar varias formas de resonancia. En conjunto, estos factores tienen como resultado una $\Delta G'^{\circ}$ grande y negativa (-31,4 kJ/mol) para la hidrólisis del acetil-CoA.

En resumen, en las reacciones de hidrólisis con variaciones de energía libre estándar grandes y negativas, los productos son más estables que los reactivos debido a una o a varias de las siguientes razones: (1) la tensión de enlace en los reactivos debida a repulsión electrostática queda liberada por la separación de carga, tal como sucede en el caso del ATP; (2) los productos están estabilizados por ionización, como en el caso del ATP, acil fosfatos y tioésteres; (3) los productos están estabilizados por isomerización (tautomerización), como sucede con el PEP; y/o (4) los productos están estabilizados por resonancia, como la creatina liberada a partir de la fosfocreatina, el ión carboxilato liberado de los acil fosfatos y tioésteres y el fosfato (P_i) liberado de enlaces anhídrido o éster.

COPY STATION

El ATP proporciona energía por transferencia de grupo y no por simple hidrólisis

A lo largo de este libro encontraremos reacciones o procesos para los que el ATP suministra energía, y la contribución del ATP a estas reacciones se indica normalmente tal como se muestra en la **Figura 13-18a**, con una flecha sencilla que muestra la conversión del ATP en ADP y P_i (o, en algunos casos, de ATP en AMP y pirofosfato, PP_i). Cuando se escriben de esta manera, estas reacciones del ATP parecen simples reacciones de hidrólisis en la que el agua desplaza al P_i (o al PP_i) y uno siente la tentación de decir que una reacción dependiente de ATP está "impulsada por la hidrólisis del ATP". Esto *no* es así. La hidrólisis del ATP per se normalmente no consigue nada excepto la liberación de calor el cual no puede impulsar un proceso químico en un sistema isotérmico. Las flechas de reacción sencillas tales como las de la Fig. 13-18a representan, casi invariablemente, un proceso en dos pasos (Fig. 13-18b) en el que parte de la molécula de ATP, ya sea un grupo fosforilo o pirofosforilo o la porción adenilato (AMP), se transfiere primero a una molécula de sustrato o a un residuo aminoácido de un enzima, quedando unido de manera covalente al sustrato o enzima y elevando así su contenido en energía libre. A continuación, en el segundo paso, se desplaza la porción que contiene el grupo fosfato transferido en el primer paso, generando P_i, PP_i o AMP como grupo saliente. Así el ATP participa *de forma covalente* en la reacción catalizada enzimáticamente a la que aporta energía libre.

TABLA 13-6 Energía libre estándar de hidrólisis de algunos compuestos fosforilados y del acetil-CoA (un tioéster)

	$\Delta G°$	
	(kJ/mol)	(kcal/mol*)
Fosfoenolpiruvato	–61.9	–14.8
1,3-bisfosfoglicerato (⟶ 3-fosfoglicerato + P_i)	–49.3	–11.8
Fosfocreatina	–43.0	–10.3
ADP (S AMP ⟶ P_i)	–32.8	–7.8
ATP (S ADP ⟶ P_i)	–30.5	–7.3
ATP (S AMP ⟶ PP_i)	–45.6	–10.9
AMP (⟶ adenosina + P_i)	–14.2	–3.4
PP_i (S 2P_i)	–19.2	–4.0
Glucosa 1-fosfato	–20.9	–5.0
Fructosa 6-fosfato	–15.9	–3.8
Glucosa 6-fosfato	–13.8	–3.3
Glicerol 3-fosfato	–9.2	–2.2
Acetil-CoA	–31.4	–7.5

Fuente: La mayor parte de datos provienen de Jencks, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (G. D. Fasman, ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, p. 296, CRC Press, 1976. Value for the free energy of hydrolysis of PP_i from P. A. Frey and A. Arabshahi, *Biochemistry* 34:11,307, 1995.

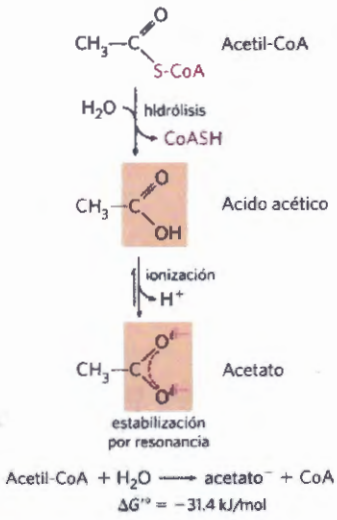


FIGURA 13-16 Hidrólisis del acetil-coenzima A. El acetil-CoA es un tioéster con una variación de energía libre estándar de hidrólisis grande y negativa. Los tioésteres contienen un átomo de azufre en la posición ocupada por un átomo de oxígeno en los ésteres de oxígeno. La estructura completa del coenzima A (CoA o CoASH) se muestra en la Fig. 8-41.

COPY-STATION

Sin embargo, algunos procesos *sí* implican la hidrólisis directa del ATP (o GTP). Por ejemplo, la unión no covalente de ATP (o de GTP), seguida de su hidrólisis a ADP (o GDP) y P_i, puede proporcionar la energía para ciclar algunas proteínas entre dos conformaciones, produciendo movimiento mecánico. Esto sucede en la contracción muscular (véase la Fig. 5-31) o en el movimiento de enzimas a lo largo del DNA (véase la Fig. 25r-31) o de los ribosomas a lo largo del RNA mensajero (véase la Fig. 27-31). Las reacciones dependientes de energía catalizadas por las helicasas, la proteína Rec A, y algunas topoisomerasas (Capítulo 25) también implican hidrólisis directa de enlaces fosfoanhídrido. Las AAA+ ATPasas que intervienen en la replicación del DNA, y otros procesos descritos en el Capítulo 25 utilizan la hidrólisis del ATP para ciclar proteínas asociadas entre las formas activa e inactiva. Las proteínas fijadoras de GTP que actúan en rutas de señalización hidrolizan directamente el GTP para impulsar cambios de conformación que finalizan señales desencadenadas por hormonas o por otros factores extracelulares (Capítulo 12).

Los compuestos fosfato que se encuentran en los organismos vivos pueden dividirse de forma algo arbitraria en dos grupos, basados en sus energías libres estándar de hidrólisis **(Fig. 13-19)**. Los compuestos de "alta energía" tienen una $\Delta G'°$ de hidrólisis más negativa que -25 kJ/mol; los compuestos de "baja energía" tienen una $\Delta G'°$ menos negativa. Según este criterio, el ATP, para el que $\Delta G'°$ de hidrólisis es -30,5 kJ/mol (-7,3 kcal/mol) es un compuesto rico en energía; la glucosa 6-fosfato, con una $\Delta G'°$ de hidrólisis de -13,8 kJ/mol (-3,3 kcal/mol), es un compuesto de baja energía.

El término "enlace fosfato rico en energía", utilizado desde hace tiempo por los bioquímicos para describir el enlace P–O roto en las reacciones de hidrólisis, es incorrecto e induce a confusión ya que sugiere de manera equivocada que el enlace por sí mismo contiene la energía. De hecho, la rotura de todos los enlaces químí-

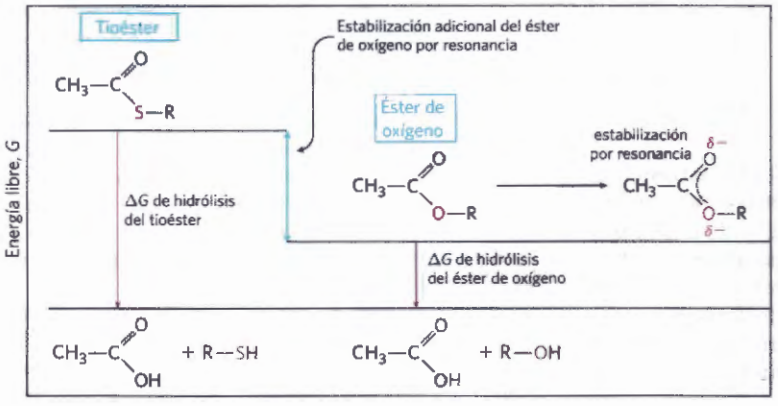


FIGURA 13-17 Energía libre de hidrólisis de los tioésteres y los ésteres de oxígeno. Los *productos* de ambos tipos de reacciones de hidrólisis tienen aproximadamente el mismo contenido de energía libre (*G*), pero el tioéster tiene un contenido de energía libre superior a la del éster de oxígeno. El solapamiento de orbitales entre los átomos de O y C permite la estabilización por resonancia en los ésteres de oxígeno, pero el solapamiento de orbitales entre los átomos de S y C no es tan bueno, y tiene lugar poca estabilización por resonancia.

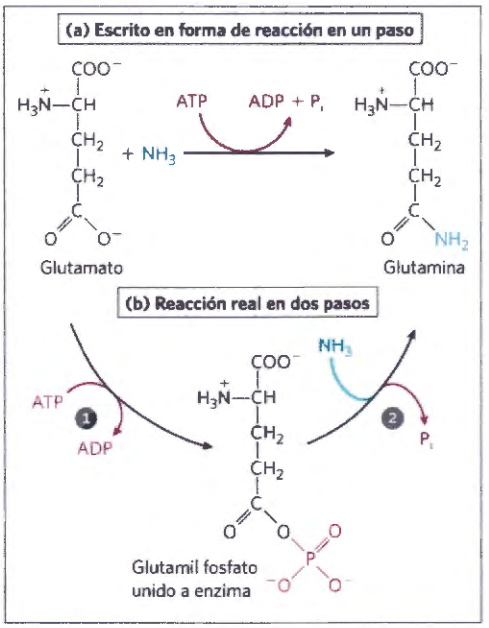


FIGURA 13-18 Hidrólisis del ATP en dos pasos. (a) La contribución del ATP a una reacción se muestra a menudo como un paso único, pero es casi siempre un proceso en dos pasos. **(b)** Se muestra aquí la reacción catalizada por la glutamina sintetasa dependiente de ATP. ❶ Se transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al glutamato, y a continuación ❷ el grupo fosforilo es desplazado por NH_3 y liberado como P_i.

cos requiere un *aporte* de energía. La energía libre liberada en la hidrólisis de los compuestos fosfatos no procede del enlace específico que se rompe; es el resultado de que los productos de la reacción tienen un contenido de energía libre menor que los reactivos. Para simplificar utilizaremos a veces el término "compuesto fosfato de alta energía" cuando nos refiramos al ATP u otros compuestos fosfato con una energía libre estándar de hidrólisis grande y negativa.

Como es evidente a partir de la aditividad de las variaciones de energía libre de las reacciones secuenciales (véase la Sección 13.1), cualquier compuesto fosforilado puede sintetizarse acoplando la síntesis a la rotura de otro compuesto fosforilado con una energía libre de hidrólisis más negativa. Por ejemplo, puesto que la escisión de P_i a partir del fosfoenolpiruvato libera más energía de la necesaria para conseguir la condensación de P_i con ADP, la donación directa de un grupo fosforilo del PEP al ADP es factible termodinámicamente:

		$\Delta G'°$(kJ/mol)
(1)	PEP + ~~H_2O~~ ⟶ piruvato + ~~P_i~~	−61.9
(2)	ADP + ~~P_i~~ ⟶ ATP + ~~H_2O~~	+30.5
Suma:	PEP + ADP ⟶ piruvato + ATP	−31.4

Obsérvese que la reacción global anterior se representa como la suma algebraica de las dos primeras reacciones aunque la reacción global es de hecho una tercera reacción, distinta, en la que no interviene el P_i; el PEP cede un grupo *fosforilo directamente* al ADP. Podemos describir los compuestos fosforilados como poseedores de un *potencial de transferencia del grupo fosforilo* alto o bajo en base a sus energías libress estándar de hidrólisis (según la Tabla 13-6). El potencial de transferencia del grupo fosforilo del PEP es muy alto, el del ATP es alto y el de la glucosa 6-fosfato es bajo (Fig. 13-19).

Gran parte del catabolismo está dirigido hacia la síntesis de compuestos fosfato de alta energía, pero su formación no es un fin en sí mismo; constituyen una forma de activar una gran variedad de compuestos para transformaciones químicas posteriores. La transferencia de un grupo fosforilo a un compuesto añade efectivamente energía libre a dicho compuesto, de forma que tiene más energía libre para ceder durante sus transformaciones metabólicas posteriores. Hemos descrito anteriormente cómo se consigue la síntesis de glucosa 6-fosfato mediante transferencia del grupo fosforilo del ATP. En el próximo capítulo veremos que esta fosforilación de la glucosa activa o "ceba" la glucosa para reacciones catabólicas que tienen lugar en prácticamente todas las células vivas. Debido a su posición intermedia en la escala de potencial de transferencia de grupo, el ATP puede transportar energía desde compuestos fosfato de alta energía producidos por el catabolismo (fosfoenolpiruvato, por ejemplo) a compuestos tales como la glucosa, convirtiéndolos en especies más reactivas. El ATP sirve así como moneda de energía universal en todas las células vivas.

Otra característica química del ATP es crucial para su papel en el metabolismo: aunque en solución acuosa el ATP es termodinámicamente inestable y es, por

COPY-STATION

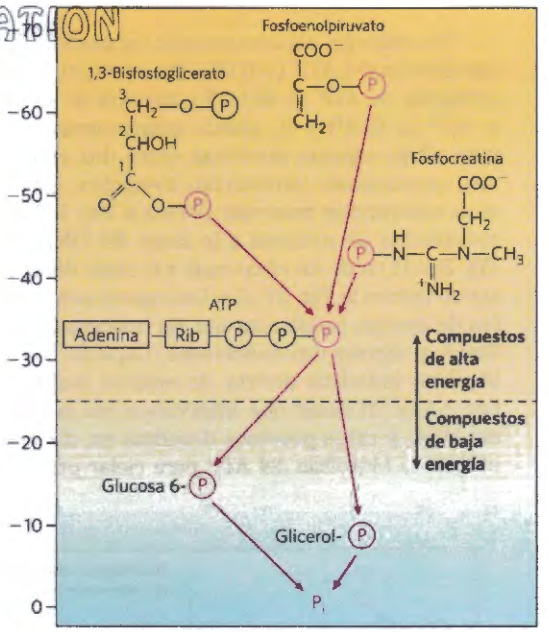


FIGURA 13-19 Clasificación de los compuestos biológicos fosforilados según sus energías libres estándar de hidrólisis. Se muestra el flujo de grupos fosforilo, representados por Ⓟ, desde grupos dadores de fosforilo de elevada energía vía ATP a moléculas aceptoras (tales como glucosa y glicerol) para formar sus derivados fosfato de baja energía. (La localización del grupo fosforilo de cada compuesto dador a lo largo de la escala indica aproximadamente la $\Delta G°$ de hidrólisis). Este flujo de grupos fosforilo, catalizado por quinasas, transcurre con una pérdida global de energía libre en las condiciones intracelulares. La hidrólisis de los compuestos fosfato de baja energía libera P_i, que tiene un potencial de transferencia de grupo fosforilo (tal como se define en el texto) aún menor.

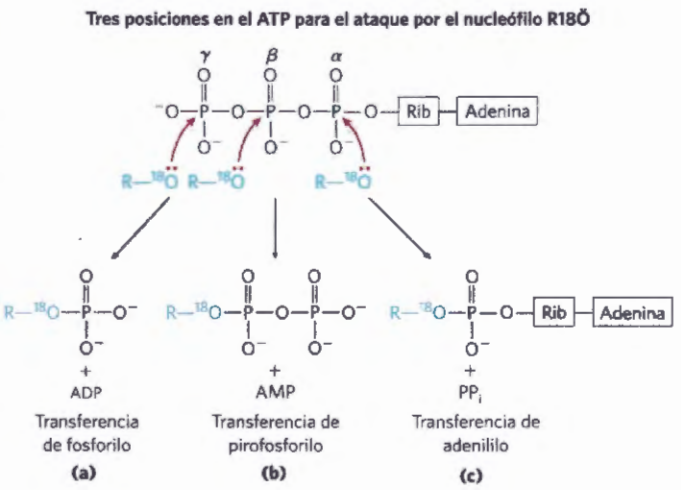


FIGURA 13-20 Reacciones de desplazamiento nucelofílico del ATP. Cualquiera de los tres átomos de P (α, β o γ) puede servir como diana electrofílica para un ataque nucleofílico, en este caso por el nucleófilo marcado $R\text{-}^{18}O$:. El nucleófilo puede ser un alcohol (ROH), un grupo carboxilo ($RCOO^-$), o un fosfoanhídrido (un nucleósido mono- o difosfato, por ejemplo). **(a)** Cuando el oxígeno del nucleófilo ataca la posición γ, se marca el oxígeno enlazante del producto, lo que indica que el grupo transferido desde el ATP es un fosforilo ($-PO_3^{2-}$) y no un fosfato ($-OPO_3^{2-}$). **(b)** El ataque sobre la posición β desplaza AMP y conduce a la transferencia de un grupo pirofosforilo (no pirofosfato) al nucleófilo. **(c)** El ataque sobre la posición α desplaza PP_i y transfiere el grupo adenililo al nucleófilo.

tanto, un buen dador de grupo fosforilo, es *cinéticamente* estable. Debido a las enormes energías de activación (200 a 400 kJ/mol) necesarias para la escisión no catalizada de sus enlaces fosfoanhídrido, el ATP no dona espontáneamente grupos fosforilo al agua o a los otros cientos de aceptores potenciales en la célula. Solamente cuando están presentes enzimas específicos para disminuir la energía de activación tiene lugar la transferencia del grupo fosforilo desde el ATP. La célula es, por tanto, capaz de regular la utilización de la energía transportada por el ATP a través de la regulación de los diversos enzimas que actúan sobre el mismo.

COPY-STATION

El ATP dona grupos fosforilo, pirofosforilo, y adenililo

Las reacciones del ATP son, generalmente, desplazamientos nucleofílicos S_N2 (véase la Sección 13.2), en los que el nucleófilo puede ser, por ejemplo, el oxígeno de un alcohol o carboxilato o un nitrógeno de la creatina o de la cadena lateral de la arginina o histidina. Cada uno de los tres fosfatos del ATP es susceptible de ataque nucleofílico **(Fig. 13-20)**, y cada posición de ataque conduce a un tipo diferente de producto.

El ataque nucleofílico por un alcohol sobre el fosfato γ (Fig. 13-20a) desplaza ADP y produce un nuevo éster fosfato. Estudios con reactivos marcados con ^{18}O han demostrado que el oxígeno puente en el nuevo compuesto proviene del alcohol y no del ATP; el grupo transferido desde el ATP es, por tanto, un fosforilo ($-PO_3^{2-}$) y no un fosfato ($-OPO_3^{2-}$). La transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al glutamato (Fig. 13-18) o a la glucosa implica el ataque sobre la posición γ de la molécula de ATP.

El ataque sobre el fosfato β del ATP desplaza AMP y transfiere un grupo pirofosforilo (no pirofosfato) al nucleófilo atacante (Fig. 13-20b). Por ejemplo, la formación del 5-fosforribosil-1-pirofosfato, un intermediario clave en la síntesis de nucleótidos, tiene lugar mediante el ataque de un -OH de la ribosa sobre el fosfato β.

El ataque nucleofílico sobre la posición α del ATP desplaza PP_i y transfiere adenilato (5'-AMP) en forma de grupo adenililo (Fig. 13-20c); la reacción es una **adenililación** (probablemente una de las palabras más desgarbadas del lenguaje bioquímico). Obsérvese que la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido α-β libera considerablemente más energía (~46 kJ/mol) que la hidrólisis del enlace β-γ (~31 kJ/mol) (Tabla 13-6). Además, el PP_i formado como subproducto de la adenililación se hidroliza a dos P_i por el enzima ubicuo **pirofosfato inorgánico hidrolasa**, liberando 19 kJ/mol y proporcionando así un "empujón" energético adicional para la reacción de adenililación. De hecho, los dos enlaces fosfoanhídrido del ATP se rompen en la reacción global. Las reacciones de adenililación son, por tanto, termodinámicamente muy favorables. Cuando se utiliza la energía del ATP para impulsar una reacción metabólica especialmente desfavorable, la adenililación es a menudo el mecanismo de acoplamiento energético. La activación de los ácidos grasos es un buen ejemplo de esta estrategia de acoplamiento energético.

El primer paso en la activación de un ácido graso, bien para su oxidación para producir energía bien para su uso en la síntesis de lípidos más complejos, es la formación de su éster tiólico (véase la Fig. 17-5). La condensación directa de un ácido graso con el coenzima A es endergónica, pero la formación del acil graso-CoA se hace exergónica mediante la eliminación por pasos de *dos* grupos fosforilo del ATP. En primer lugar, se transfiere adenilato (AMP) desde el ATP al grupo carboxilo del ácido graso, formando un anhídrido mixto (acil graso adenilato) y liberando PP_i. El grupo tiol del coenzima A desplaza a continuación el grupo adenililo y forma un tioéster con el ácido graso. La suma de estas dos reacciones es energéticamente equivalente a la hidrólisis exergónica del ATP a AMP y PP_i ($\Delta G'^\circ = -45{,}6$ kJ/mol) y la formación endergónica del acil graso-CoA. La formación del acil graso-CoA ($\Delta G'^\circ = 31{,}4$ kJ/mol) se hace energéticamente favorable mediante la hidrólisis del PP_i por la pirofosfato inorgánico hidrolasa. Así, en la activación de un ácido graso, se rompen los dos enlaces fosfoanhídrido del ATP. La $\Delta G'^\circ$ resultante es la suma de los valores de $\Delta G'^\circ$ para la rotura de estos enlaces, a saber, -45,6 kJ/mol + (-19,22) kJ/mol:

$$ATP + 2H_2O \longrightarrow AMP + 2P_i \quad \Delta G'^\circ = -64.8 \text{ kJ/mol}$$

La activación de los aminoácidos antes de su polimerización en forma de proteínas (véase la Fig. 27-19) se

consigue mediante un conjunto de reacciones análogo en el que una molécula de RNA de transferencia hace las veces de coenzima A. En la luciérnaga se produce una utilización interesante de la rotura de ATP a AMP y PP_i, que usa el ATP como fuente de energía para producir destellos de luz (Recuadro 13-1).

La formación de macromoléculas informativas requiere energía

Cuando se unen precursores sencillos formando polímeros de elevada masa molecular con secuencias definidas (DNA, RNA, proteínas), tal como se describe detalladamente en la Parte III, se requiere energía tanto para la condensación de las unidades monoméricas como para la creación de secuencias *ordenadas*. Los precursores de la síntesis del DNA y del RNA son nucleósido trifosfatos, y la polimerización va acompañada de la rotura de la unión fosfoanhídrido entre los fosfatos α y β, con liberación de PP_i (Fig. 13-20). Las porciones transferidas al polímero creciente en estas reacciones son adenilato (AMP), guanilato (GMP), citidilato (CMP) o uridilato (UMP) en la síntesis del RNA, o sus análogos desoxi (con TMP en lugar de UTP) en la síntesis del DNA. Como hemos señalado antes, en la activación de aminoácidos para la síntesis de proteínas interviene la donación de grupos adenililo del ATP, y tal como veremos en el Capítulo 27 varios pasos de la síntesis de proteínas en el ribosoma están también acompañadas de la hidrólisis de GTP. En todos estos casos la rotura exergónica de un nucleósido trifosfato está acoplada al proceso endergónico de síntesis de un polímero con una secuencia específica.

El ATP aporta energía para el transporte activo y la contracción muscular

El ATP puede suministrar la energía para transportar un ión o una molécula a través de una membrana a otro compartimiento acuoso en donde su concentración es superior (véase la Fig. 11-36). Los procesos de transporte son grandes consumidores de energía; en el riñón y el cerebro humanos, por ejemplo, hasta dos tercios de la energía consumida en reposo es utilizada para bombear Na^+ y K^+ a través de las membranas plasmáticas vía la Na^+K^+ ATPasa. El transporte de Na^+ y K^+ está impulsado por la fosforilación y desfosforilación cíclicas de la proteína transportadora, con el ATP como dador de grupo fosforilo. La fosforilación dependiente de Na^+ de la Na^+K^+ ATPasa fuerza un cambio en la conformación de la proteína, mientras que la desfosforilación dependiente de K^+ favorece el retorno a la conformación original. Cada ciclo del proceso de transporte da lugar a la conversión de ATP en ADP y P_i, y es la variación de energía libre de la hidrólisis del ATP la que impulsa los cambios cíclicos en la conformación de la proteína que dan lugar al bombeo electrogénico de Na^+ y K^+. Obsérvese que, en este caso, el ATP interacciona covalentemente a través de la transferencia de grupo fosforilo al *enzima*, no al *sustrato*.

En el sistema contráctil de las células del músculo esquelético, la miosina y la actina están especializadas en la transducción de la energía química del ATP en movimiento (véase la Fig. 5-31). El ATP se une fuertemente, aunque no de forma covalente, a una conformación de la miosina, manteniendo la proteína en esta conformación. Cuando la miosina cataliza la hidrólisis de su ATP ligado, el ADP y el P_i se disocian de la proteína permitiendo que ésta se relaje a una segunda conformación hasta que se une otra molécula de ATP. La unión y posterior hidrólisis del ATP (por la ATPasa de la miosina) proporciona la energía que fuerza cambios cíclicos en la conformación de la cabeza de la miosina. El cambio de conformación de muchas moléculas individuales de miosina da lugar al deslizamiento de las fibrillas de miosina a lo largo de los filamentos de actina (véase la Fig. 5-30), lo que se traduce en la contracción macroscópica de la fibra muscular. Esta producción de movimiento mecánico a expensas del ATP es, como se ha señalado anteriormente, uno de los pocos casos en los que la hidrólisis per se del ATP, y no la transferencia de grupo desde el ATP, es la fuente de energía química en un proceso acoplado.

Las transfosforilaciones entre nucleótidos se dan en todos los tipos celulares

Aunque nos hemos centrado en el ATP como moneda energética celular y dador de grupos fosforilo, los otros nucleósido trifosfatos (GTP, UTP y CTP), y todos los desoxinucleósido trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) son energéticamente equivalentes al ATP. Los cambios de energía libre estándar asociados con la hidrólisis de sus enlaces fosfoanhídrido son casi idénticos a los mostrados en la Tabla 13-6 para el ATP. En preparación para sus diversos papeles biológicos, estos otros nucleótidos se generan y mantienen en forma de nucleósidos trifosfato (NTP) por transferencia de grupos fosforilo a los correspondientes nucleósidos difosfato (NDP) y monofosfato (NMP).

El ATP es el compuesto fosfato de alta energía primario producido por el catabolismo, en los procesos de la glucólisis, la fosforilación oxidativa y, en las células fotosintéticas, la fotofosforilación. Varios enzimas transportan a continuación grupos fosforilo desde el ATP a los otros nucleótidos. La **nucleósido difosfato quinasa**, que se encuentra en todas las células, cataliza la reacción

$$\text{ATP} + \text{NDP(o dNDP)} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{ADP} + \text{NTP(o dNTP)} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Aunque esta reacción es completamente reversible, la proporción relativamente elevada [ATP]/[ADP] en las células normalmente desplaza la reacción hacia la derecha, con formación neta de los NTP y dNTP. El enzima cataliza en realidad una transferencia de grupo fosforilo en dos pasos que es un ejemplo clásico de mecanismo de doble desplazamiento (Ping-Pong) (**Fig. 13-21**; véase también la Fig. 6-13b). En primer lugar, la transferencia de un grupo fosforilo desde al ATP a una His del sitio activo produce un intermedio fosfoenzima; a continuación el grupo fosforilo se transfiere desde el residuo Ⓟ-His a un NDP aceptor. Puesto que el enzima no es específico para la base del NDP y funciona igual de bien sobre dNDP que con NDP, puede sintetizar todos los NTP y dNTP, a partir de los correspondientes NDP y un suministro de ATP.

COPY-STATION

RECUADRO 13-1 Los destellos de la luciérnaga: informes resplandecientes del ATP

La bioluminiscencia requiere cantidades considerables de energía. En la luciérnaga, se utiliza el ATP en un conjunto de reacciones que convierten energía química en energía luminosa. Los machos emiten un destello para atraer a las hembras que, a su vez, retornan un destello para indicar su interés. En la década de 1950 y a partir de muchos millares de luciérnagas recogidas por niños en Baltimore y alrededores, William McElroy y sus colaboradores de la Johns Hopkins University aislaron los principales componentes bioquímicos: la luciferina, un ácido carboxílico complejo y la luciferasa, un enzima. La generación de un destello de luz requiere la activación de la luciferina por una reacción enzimática en la que se produce una escisión de pirofosfato del ATP formando luciferil adenilato (Fig. 1). En presencia de oxígeno molecular y luciferasa, la luciferina experimenta una descarboxilación oxidativa en varios pasos a oxiluciferina. Este proceso va acompañado de emisión de luz. El color del destello de luz difiere según la especie de luciérnaga y parece estar determinado por diferencias en la estructura de la luciferasa. La luciferina se regenera a partir de la oxiluciferina en una serie de reacciones posteriores.

En el laboratorio se utilizan luciferina y luciferasa puras para medir cantidades muy pequeñas de ATP a través de la intensidad del destello de la luz producida. De esta manera se pueden medir concentraciones de ATP tan bajas como unos pocos picomoles (10^{-12} mol). La pirosecuenciación de gen próximo del DNA se basa en destellos de luz obtenidos en las reacción luciferina-luciferasa para detectar la presencia de ATP después de la adición de nucleótidos a una cadena en crecimiento de DNA (véase la Fig. 8-36).



La luciérnaga, un escarabajo de la familia *Lampyridae*

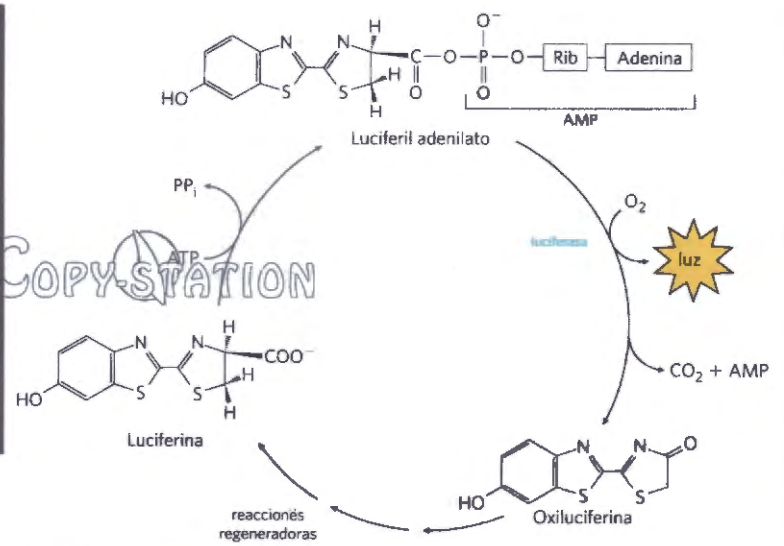


FIGURA 1 Componentes importantes en el ciclo de bioluminiscencia de la luciérnaga.

Las transferencias de grupo fosforilo desde el ATP provocan la acumulación de ADP; por ejemplo, cuando el músculo se contrae fuertemente, el ADP se acumula e interfiere con la contracción dependiente de ATP. En períodos de demanda intensa de ATP, la célula disminuye la concentración de ADP, al tiempo que adquiere ATP, mediante la reacción de la **adenilato quinasa:**

$$2\text{ADP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{ATP} + \text{AMP} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Esta reacción es completamente reversible, de forma que cuando cesa la demanda intensa de ATP el enzima puede reciclar también AMP convirtiéndolo en ADP, el cual a continuación puede fosforilarse a ATP en la mitocondria. Un enzima similar, la guanilato quinasa, convierte GMP en GDP a expensas de ATP. A través de rutas como éstas, la energía conservada en la producción catabólica de ATP se utiliza para suministrar a la célula todos los NTP y dNTP requeridos.

La fosfocreatina (PCr; Fig. 13-15), llamada también creatina fosfato, sirve como una fuente disponible de grupos fosforilo para la síntesis rápida de ATP a partir de ADP. La concentración de PCr en el músculo esquelético es aproximadamente 30 mM, casi diez veces la concentración de ATP, y en otros tejidos tales como el músculo liso, cerebro, y riñón es de 5 a 10 mM. El enzima **creatina quinasa** cataliza la reacción reversible

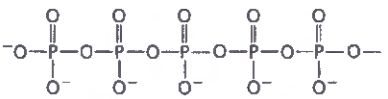
$$\text{ADP} + \text{PCr} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{ATP} + \text{Cr} \qquad \Delta G'^{\circ} = -12.5\ \text{kJ/mol}$$

Cuando una demanda repentina de energía agota el ATP, la reserva de PCr se utiliza para reponer ATP a una velocidad considerablemente mayor que la que puede sintetizar ATP a través de las rutas catabólicas. Cuando

disminuye la demanda de energía, el ATP producido por el catabolismo se utiliza para reponer la reserva de PCr por inversión de la reacción de la creatina quinasa (véase el Recuadro 23-2). Los organismos de los phyla inferiores emplean otras moléculas semejantes a la PCr (denominadas colectivamente **fosfágenos**) como depósitos de fosforilo.

El polifosfato inorgánico es un dador potencial de grupos fosforilo

El polifosfato inorgánico, poliP (o $(poliP)_n$ en donde n es el número de residuos ortofosfato) es un polímero lineal compuesto de muchas decenas o centenas de residuos P_i unidos a través de enlaces fosfoanhídrido. Este polímero, presente en todos los organismos, puede acumularse en grandes cantidades en algunas células. Por ejemplo, en la levadura, la cantidad de PoliP que se acumula en las vacuolas representaría, si se distribuyese de manera uniforme por toda la célula, una concentración de 200 mM! (Compárese con las concentraciones de otros dadores de grupos fosforilo mencionados en la Tahla 13-5).



Polifosfato inorgánico (PoliP)

Un papel potencial del PoliP es el de fosfágeno, una reserva de grupos fosforilo que se puede utilizar para generar ATP, de la misma manera que se utiliza la creatina fosfato en el músculo. El poliP tiene aproximadamente el mismo potencial de transferencia de grupos fosforilo que el PP_i. El polifosfato más corto, PP_i (n = 2), puede servir como fuente de energía para el transporte activo de H^+ a través de la membrana vacuolar en células vegetales. Para al menos una forma del enzima fosfofructoquinasa de vegetales, el PP_i es el dador de grupos fosforilo, un papel asignado al ATP en animales y microbios. El hallazgo de elevadas concentraciones de poliP en condensados volcánicos y respiraderos de vapor sugiere que podría haber servido como fuente de energía en la evolución prebiótica y celular temprana.

En las bacterias el enzima **polifosfato quinasa-1** (PPK-1) cataliza la reacción reversible:

$$ATP + (poliP)_n \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} ADP + (poliP)_{n+1}$$

$$\Delta G'^{\circ} = -20 \text{ kJ/mol}$$

a través de un mecanismo en el que interviene un intermedio Ⓟ–His unido al enzima (recuérdese el mecanismo de la nucleósido difosfato quinasa, descrito en la Fig. 13-21). Un segundo enzima, **polifosfato quinasa-2** (PPK-2), cataliza la síntesis reversible de GTP (o ATP) a partir de polifosfato y GDP o (ADP):

$$GDP(ADP) + (poliP)_{n+1} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} GTP(ATP) + (poliP)_n$$

Se cree que la PPK-2 actúa principalmente en la dirección de síntesis de GTP y ATP y que la PPK-1 lo hace en la dirección de la síntesis de polifosfato. PPK-1 y PPK-2 están presentes en un gran número de bacterias incluidas muchas especies patógenas.

En las bacterias se ha observado que niveles elevados de poliP promueven la expresión de genes que intervienen en la adaptación a condiciones de inanición u otras amenazas para la supervivencia. En *Escherichia coli*, por ejemplo, el poliP se acumula cuando las células se hacen crecer en un medio con carencia de aminoácidos o de P_i, y esta acumulación confiere una ventaja de supervivencia. La eliminación de los genes de las polifosfato quinasas disminuye la capacidad de ciertas bacterias patógenas de invadir tejidos animales. Podría demostrarse que los enzimas son, por tanto, dianas adecuadas para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

Ningún gen de la levadura codifica una proteína de tipo PPK, pero un complejo de proteínas relacionadas con la actina puede llevar a cabo la síntesis de polifosfato. El mecanismo de síntesis de polifosfato en los eucariotas parece ser muy diferente al de los procariotas.

Copyright

RESUMEN 13.3 Transferencias de grupo fosforilo y ATP

- El ATP constituye la unión química entre catabolismo y anabolismo. Es la moneda energética de la célula viva. La conversión exergónica del ATP a ADP y P_i, o a AMP y PP_i, está acoplada a muchas reacciones y procesos endergónicos.
- La hidrólisis directa del ATP es la fuente de energía en algunos procesos impulsados por cambios de conformación pero, en general, no es la hidrólisis del ATP sino la transferencia de un grupo fosforilo, pirofosforilo o adenililo del ATP al sustrato o al enzima la que acopla la energía de rotura del ATP a transformaciones endergónicas de sustratos.
- A través de estas reacciones de transferencia de grupo, el ATP proporciona la energía para las reacciones anabólicas, incluida la síntesis de macromoléculas portadoras de información, y para el transporte de molécu-

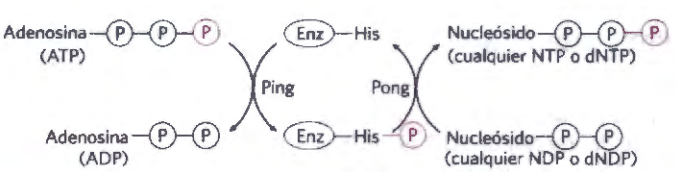


FIGURA 13-21 Mecanismo ping-pong de la nucleósido difosfato quinasa. El enzima une su primer sustrato (ATP en nuestro ejemplo) y se transfiere un grupo fosforilo a la cadena lateral de un residuo His. Sale el ADP que es reemplazado por otro nucleósido (o desoxinucleósido) difosfato que se convierte en el correspondiente trifosfato por transferencia del grupo fosforilo desde el residuo de fosfohistidina

las e iones a través de las membranas contra gradientes de concentración o de potencial eléctrico.

- Para mantener su elevado potencial de transferencia de grupo, la concentración ATP debe mantenerse muy por encima de la concentración de equilibrio mediante reacciones del catabolismo que producen energía.
- Las células contienen otros metabolitos con energías libres de hidrólisis grandes y negativas. Entre ellos se incluyen el fosfoenolpiruvato, el 1,3-bisfosfoglicerato y la fosfocreatina. Estos compuestos de elevada energía, al igual que el ATP, tienen un potencial de transferencia del grupo fosforilo elevado. Los tioésteres también tiene elevadas energías libres de hidrólisis.
- El polifosfato inorgánico, presente en todas las células, puede servir como reserva de grupos fosforilo con elevado potencial de transferencia de grupo.

13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas

La transferencia de grupos fosforilo es una de las características centrales del metabolismo. De igual importancia es otro tipo de transferencia, la transferencia de electrones en las reacciones de oxidación-reducción, a veces denominadas reacciones redox. En estas reacciones se produce la pérdida de electrones por una especie química, que es así oxidada, y la ganancia de electrones por otra, que es reducida. El flujo de electrones en las reacciones de oxidación-reducción es responsable, directa o indirectamente, de todo el trabajo realizado por los organismos vivos. En los organismos no fotosintéticos, la fuente de electrones son compuestos reducidos (alimentos); en los organismos fotosintéticos, el dador de electrones inicial es una especie química excitada por absorción de la luz. La ruta del flujo de electrones en el metabolismo es compleja. Los electrones pasan desde diversos intermedios metabólicos a transportadores de electrones especializados en reacciones catalizadas por enzimas. Los transportadores ceden, a su vez, los electrones a aceptores con afinidad por los electrones más elevada, liberando energía. Las células contienen una serie de transductores de energía molecular que transforman la energía del flujo de electrones en trabajo útil.

Empezaremos discutiendo de qué modo una fuerza electromotriz (fem) puede realizar trabajo, después consideraremos las bases teóricas y experimentales para la determinación de los cambios de energía en las reacciones de oxidación en términos de fem y la relación entre esta fuerza, expresada en voltios, y la variación de energía libre, expresada en joules. También se describen las estructuras y la química de oxidación-reducción de los transportadores de electrones especializados más comunes, que encontraremos repetidamente en capítulos posteriores.

El flujo de electrones puede realizar trabajo biológico

Cada vez que utilizamos un motor, una lámpara o calefactor eléctricos, o una chispa para encender la gasolina en un motor de coche, utilizamos el flujo de electrones para realizar trabajo. En el circuito que alimenta un motor, la fuente de electrones puede ser una batería que contiene dos especies químicas que difieren en su afinidad por los electrones. Los cables eléctricos proporcionan una ruta para el flujo de electrones desde la especie química en un polo de la batería, a través del motor, a la especie química en el otro polo de la batería. Debido a que las dos especies químicas difieren en su afinidad por los electrones, éstos fluyen espontáneamente a través del circuito, impulsados por una fuerza proporcional a la diferencia en afinidad electrónica, la **fuerza electromotriz, fem**. La fem (normalmente unos pocos voltios) puede realizar trabajo si se coloca en el circuito un transductor de energía adecuado, en este caso un motor. El motor se puede acoplar a diferentes dispositivos mecánicos para realizar trabajo útil.

Las células vivas tienen un "circuito" biológico análogo, con un compuesto relativamente reducido tal como la glucosa como fuente de electrones. A medida que la glucosa se oxida enzimáticamente, los electrones liberados fluyen espontáneamente a través de una serie de transportadores de electrones intermedios a otra especie química, tal como el O_2. Este flujo de electrones es exergónico, porque el O_2 tiene una afinidad por los electrones mayor que la que tienen los transportadores de electrones intermedios. La fem resultante proporciona energía a una serie de transductores moleculares de energía (enzimas y otras proteínas) que realizan el trabajo biológico. En la mitocondria, por ejemplo, enzimas ligados a la membrana acoplan el flujo de electrones a la producción de una diferencia de pH transmembrana y a un potencial eléctrico transmembrana, con lo que se consigue trabajo osmótico y eléctrico. El gradiente de protones así formado tiene energía potencial, a veces llamada fuerza protón-motriz por analogía con la fuerza electromotriz. Otro enzima, la ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, utiliza la fuerza protón-motriz para realizar trabajo químico: síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a medida que los protones fluyen espontáneamente a través de la membrana. De forma parecida, enzimas localizados en la membrana de *E. coli* convierten la fem en fuerza protón-motriz, que se utiliza seguidamente para accionar el movimiento flagelar. Los principios de la electroquímica que gobiernan los cambios de energía en el circuito macroscópico con un motor y batería se aplican con igual validez a los procesos moleculares que acompañan el flujo de electrones en las células vivas.

Las óxido-reducciones se pueden describir en forma de semirreacciones

Aunque la oxidación y la reducción han de tener lugar conjuntamente, es conveniente al describir transferencias electrónicas considerar las dos mitades de una reacción de oxidación-reducción de forma separada. Por ejemplo, la oxidación del ión ferroso por el ión cúprico:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

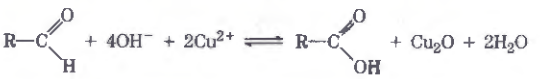
se puede describir en términos de dos semirreacciones:

$$(1) \quad Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^{-}$$

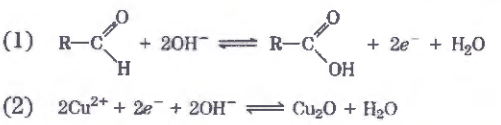
$$(2) \quad Cu^{2+} + e^{-} \rightleftharpoons Cu^{+}$$

La molécula dadora de electrones en una reacción de oxidación-reducción se denomina agente reductor o reductor; la molécula aceptora de electrones es el agente oxidante u oxidante. Un agente determinado, tal como un catión hierro en el estado ferroso (Fe^{2+}) o el férrico (Fe^{3+}), funciona como un par reductor-oxidante conjugado (par redox), tal como un ácido y su base correspondiente funcionan como un par ácido-base conjugado. Recuérdese del Capítulo 2 que en las reacciones ácido-base podemos escribir una ecuación general: dador de protones $\rightleftharpoons$ H^+ + aceptor de protones. En las reacciones redox podemos escribir una ecuación general similar: dador de electrones (reductor) $\rightleftharpoons$ e^- + aceptor de electrones (oxidante). En la semirreacción reversible (1) anterior, el Fe^{2+} es el dador de electrones y el Fe^{3+} es el aceptor de electrones; conjuntamente, Fe^{2+} y Fe^{3+} constituyen un **par redox conjugado**.

Las transferencias de electrones en las reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos no son fundamentalmente diferentes de las de las especies inorgánicas. Consideremos la oxidación de un azúcar reductor (un aldehído o cetona) por el ión cúprico:



Esta reacción global puede expresarse en forma de dos semirreacciones:



Observe que se eliminan dos electrones del carbono aldehídico, la segunda semirreacción (la reducción por un electrón del ión cúprico a cuproso) se ha de multiplicar por dos para equilibrar la ecuación global.

En las oxidaciones biológicas interviene con frecuencia la deshidrogenación

El carbono aparece en las células vivas en diferentes estados de oxidación **(Fig. 13-22)**. Cuando un átomo de carbono comparte un par de electrones con otro átomo (típicamente H, C, S, N u O), lo comparten de manera desigual en favor del átomo más electronegativo. El orden de electronegatividad creciente es H < C < S < N < O). En términos muy simplificados, pero útiles, los electrones enlazantes que se comparten con otro átomo "pertenecen" al átomo más electronegativo. Por ejemplo, en el metano (CH_4), el carbono es más electronegativo que los cuatro hidrógenos a que está unido, y por lo tanto los ocho electrones enlazantes "pertenecen" al átomo de C (Fig. 13-22). En el etano, los electrones del enlace C–C son compartidos por igual, de forma que a cada átomo de carbono le "pertenecen" sólo siete de sus ocho electrones enlazantes. En el etanol, el C-1 es menos electronegativo que el oxígeno al que está unido, y por tanto los dos electrones del enlace C–O "pertenecen" al átomo de O, dejando al C-1 con sólo cinco electrones enlazantes. Con cada pérdida formal de electrones enlazantes "propios", el átomo de carbono ha sufrido una oxidación, incluso cuando no interviene ningún oxígeno, como en la conversión de un alcano ($-CH_2-CH_2-$) a un alqueno (-CH=CH-). En este caso, la oxidación (pérdida de electrones) coincide con la pér-

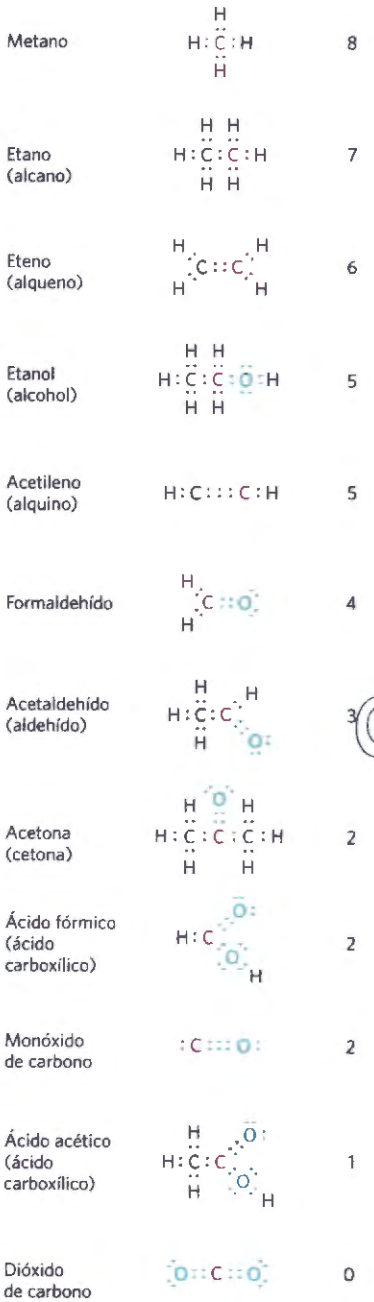


FIGURA 13-22 Diferentes estados de oxidación del carbono en la biosfera. Para entender los estados de oxidación de estos fíjese en el carbono en rojo y sus electrones enlazantes. Cuando este carbono esta enlazado al átomo de H, menos electronegativo, ambos electrones enlazantes (en rojo) se asignan al carbono. Cuando el carbono está enlazado a otro carbono, los electrones enlazantes se comparten por igual, de forma que uno de los dos electrones se asigna al carbono en rojo. Cuando el carbono en rojo está unido al átomo de oxigeno, más electronegativo, los electrones enlazantes se asignan al oxigeno. El número a la derecha de cada compuesto es el numero de electrones que "pertenecen" al carbono en rojo, una expresión aproximada del grado de oxidación de este compuesto. Cuando el carbono en rojo se oxida (pierde electrones), el número se hace menor

COPY-STATION

dida de hidrógeno. En los sistemas biológicos, tal como hemos observado anteriormente en el capítulo, la oxidación es a menudo sinónimo de **deshidrogenación**, y muchos enzimas que catalizan reacciones de oxidación son **deshidrogenasas**. Obsérvese que los compuestos más reducidos de la Figura 13-22 (parte superior) son más ricos en hidrógeno que en oxígeno, mientras que los compuestos más oxidados (parte inferior) tienen más oxígeno y menos hidrógeno.

No en todas las reacciones biológicas de oxidación-reducción interviene el carbono. Por ejemplo, en la conversión de nitrógeno molecular en amoníaco, $6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$, los átomos de nitrógeno son reducidos.

Los electrones se transfieren de una molécula (dador de electrones) a otra (aceptor de electrones) de cuatro formas diferentes:

1. Directamente como *electrones*. Por ejemplo, el par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} puede transferir un electrón al par redox Cu^+/Cu^{2+}:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^+$$

2. En forma de *átomos de hidrógeno*. Recuérdese que un átomo de hidrógeno consiste en un protón (H^+) y un único electrón (e^-). En este caso podemos escribir la ecuación general

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

en donde AH_2 es el dador de hidrógeno/electrón. (No confundir la reacción anterior con una disociación de ácido en la que interviene un protón pero no un electrón). AH_2 y A conjuntamente constituyen un par redox conjugado (A/AH_2),que puede reducir otro compuesto B (o un par redox B/BH_2) por transferencia de átomos de hidrógeno:

$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$$

3. En forma de *ión hidruro* ($:H^-$), que tiene dos electrones. Esto sucede en el caso de las deshidrogenasas ligadas a NAD descritas más adelante.

4. A través de una *combinación directa con oxígeno*. En este caso, el oxígeno se combina con un reductor orgánico y se incorpora de forma covalente en el producto, tal como sucede en la oxidación de un hidrocarburo a alcohol:

$$R{-}CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R{-}CH_2{-}OH$$

El hidrocarburo es el dador de electrones y el átomo de oxígeno es el aceptor de electrones.

Los cuatro tipos de transferencia electrónica se dan en las células. El término neutro **equivalente de reducción** se utiliza normalmente para designar un equivalente de electrones simple que participa en una reacción de oxidación-reducción, sin importar si este equivalente es un electrón per se, un átomo de hidrógeno, o un ión hidruro o si la transferencia de electrones tiene lugar en una reacción con oxígeno para dar un producto oxigenado.

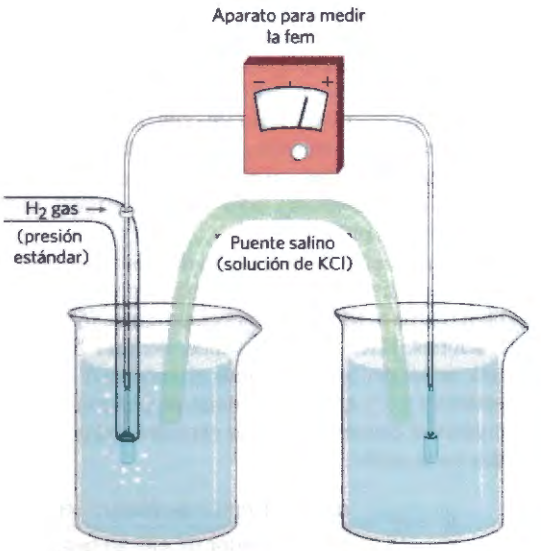


FIGURA 13-23 Medición del potencial de reducción estándar (E°) de un par redox. Los electrones fluyen desde el electrodo de prueba al electrodo de referencia, o viceversa. En último término la semicelda de referencia es el electrodo de hidrógeno, tal como se muestra aquí, a pH 0. La fuerza electromotriz (fem) de este electrodo se toma como 0,00 V. A pH 7 en la celda de referencia (y 25 °C), E° del electrodo de hidrógeno es −0,414 V. La dirección del flujo de electrones depende de la "presión" o potencial electrónico relativo de las dos celdas. Un puente salino que contiene una solución saturada de KCl proporciona una vía para el movimiento de contraiones entre la celda de prueba y la celda de referencia. A partir de la fem observada y la fem conocida de la celda de referencia, se puede obtener la fem de la celda de ensayo que contiene el par redox. Por convención, la celda que gana electrones tiene el potencial de reducción más positivo.

Los potenciales de reducción son una medida de la afinidad por los electrones

Cuando en una solución se encuentran conjuntamente dos pares redox conjugados, se puede producir espontáneamente la transferencia de electrones desde el dador de electrones de un par al aceptor de electrones del otro. La tendencia a que tenga lugar tal reacción depende de la afinidad relativa del aceptor de electrones de cada par redox por los electrones. El **potencial de reducción estándar, E°,** que es una medida (en voltios) de esta afinidad, puede determinarse en un experimento tal como el descrito en la **Figura 13-23**. Los electroquímicos han escogido como estándar de referencia la semirreacción

$$H^+ + e^- \longrightarrow \tfrac{1}{2}H_2$$

Al electrodo en el que tiene lugar esta semirreacción (denominado una semicelda) se le asigna arbitrariamente un E° de 0,00 V. Cuando se conecta este electrodo de hidrógeno a través de un circuito externo a otra semicelda en la que están presentes las especies oxidada y reducida en concentración estándar (cada soluto a 1 M, cada gas a 101,3 kPa, todo a 25 °C), los electrones

tienden a fluir a través del circuito externo desde la semicelda con E° más bajo a la semicelda con E° más elevado. Por convención, a la semicelda que toma electrones de la celda de hidrógeno estándar se le asigna un valor de E° positivo y a la que dona electrones a la celda de hidrógeno un valor negativo. Cuando dos semiceldas cualesquiera están conectadas, la que tiene una E° mayor (más positiva) será reducida; tiene un mayor potencial de reducción.

El potencial de reducción de una semicelda depende de no sólo de las especies químicas presentes sino también de sus actividades, o por aproximación sus concentraciones. Hace unos cien años, Walther Nernst dedujo una ecuación que relaciona el potencial de reducción estándar (E°) con el potencial de reducción real (E) a cualquier concentración de especies oxidadas y reducidas en la celda:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{aceptor de electrones}]}{[\text{dador de electrones}]} \qquad (13\text{-}5)$$

en donde R y T tienen su significado habitual, n es el número de electrones transferidos y F es la constante de Faraday, una constante de proporcionalidad que convierte volts en joules (Tabla 13-1). A 298 K (25 °C), esta expresión se simplifica a

$$E = E^\circ + \frac{0.026\ \text{V}}{n} \ln \frac{[\text{aceptor de electrones}]}{[\text{dador de electrones}]} \qquad (13\text{-}6)$$

›› **convención clave:** En muchas de las semirreacciones de interés para los bioquímicos intervienen protones. Al igual que en la definición de $\Delta G'^\circ$, los bioquímicos definen el estado estándar para las reacciones de oxidación-reducción a pH 7 y expresan el potencial de reducción como E'°, el potencial de reducción estándar a pH 7 Y 25 °C. Por convención, $\Delta E'^\circ$ para cualquier reacción redox viene dado como E'° del aceptor electrónico menos E'°del dador de electrones. ‹‹

Los potenciales de reducción estándar que se dan en la Tabla 13-7 y que se utilizan en este libro son valores de E'° y, por consiguiente, son válidos solamente para sistemas a pH neutro. Cada valor representa la diferencia de potencial cuando el par redox conjugado a concentraciones 1 M, 25 °C y pH 7 está conectado con el electrodo estándar de hidrógeno (pH 0). Observe en la Tabla 13-7 que cuando el par conjugado $2H^+/H_2$ a pH 7 está conectado con el electrodo de hidrógeno estándar (pH 0), los electrones tienden a fluir desde la celda de pH 7 a la celda estándar (pH 0); el E'° medido para el para $2H^+/H_2$ es -0,414 V.

Los potenciales de reducción estándar permiten el cálculo de la variación de energía libre

¿Por qué son tan útiles para el bioquímico los potenciales de reducción? Cuando se han determinado los valores de E para cualquier par de semiceldas, en relación al electrodo estándar de hidrógeno, son también conocidos sus potenciales de reducción en relación uno con otro. Uno puede, por tanto, predecir la dirección en la que tenderán a fluir los electrones cuando estas dos semiceldas se conecten a través de un circuito externo, o cuando los componentes de las dos semiceldas estén presentes conjuntamente en la misma solución. Los electrones tienen tendencia a fluir en dirección a la semicelda con el E más positivo y la fuerza de esta tendencia es proporcional a la diferencia en los potenciales de reducción, ΔE. La energía puesta a disposición por este flujo espontáneo de electrones (la variación de energía libre, ΔG, para la reacción de oxidación-reducción) es proporcional a ΔE:

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad \text{or} \quad \Delta G'^\circ = -nF\Delta E'^\circ \qquad (13\text{-}7)$$

donde n representa el número de electrones transferidos en la reacción. Con esta ecuación es posible calcular la variación de energía libre real para cualquier reacción de oxidación-reducción a partir de los valores de E'° de una tabla de potenciales de reducción (Tabla 13-7) y la concentración de las especies que intervienen en la reacción.

EJEMPLO PRÁCTICO 13-3 Cálculo de ΔG° y ΔG de una reacción redox

Calcule la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^\circ$, para la reacción en la que el acetaldehído es reducido por el transportador de electrones biológico NADH:

$$\text{Acetaldehído} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{etanol} + \text{NAD}^+$$

A continuación calcule la variación de energía libre *real*, ΔG, cuando [acetaldehído], y [NADH] son 1,00 mM y [etanol] y [NAD^+] son 0,100 M. Las semirreacciones pertinentes y sus valores de E'° son:

(1) $\text{Acetaldehído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{etanol}$
$E'^\circ = -0.197$ V

(2) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$
$E'^\circ = -0.320$ V

Recuerde que, por convención, $\Delta E'^\circ$ se expresa como E'° para el aceptor de electrones menos E'° para el dador de electrones. Representa la diferencia entre las afinidades por los electrones de las dos medias reacciones en la tabla de potenciales de reducción (Tabla 13-7). Observe que cuanto más separadas están en la tabla las dos medias reacciones, más energética es la reacción de transferencia electrónica cuando se dan los dos medias reacciones al mismo tiempo. Por convención, en las tablas de potenciales de reducción, todas las medias reacciones están representadas como reducciones, pero cuando las dos medias reacciones tienen lugar al mismo tiempo, una de ellas ha de ser una oxidación. Aunque aquella semirreacción transcurrirá en la dirección opuesta a la mostrada en la Tabla 13-7, *no cambiamos el signo* de la semirreacción antes de calcular $\Delta E'^\circ$ porque $\Delta E'^\circ$ se *define* como una diferencia de potenciales de reducción.

Solución: Puesto que el acetaldehído está aceptando electrones ($n = 2$) del NADH, $\Delta E'^\circ$= -0,197 V -(-0,320 V) = 0,123 V. Por tanto,

$$\Delta G'^\circ = -nF\Delta E'^\circ = -2(96.5\ \text{kJ/V·mol})(0.123\ \text{V}) = -23.7\ \text{kJ/mol}$$

Esta es la variación de energía libre para la reacción de oxidación-reducción a 25 °C y pH 7 cuando el acetalde-

TABLA 13-7 Potenciales de reducción estándar de algunas semirreacciones biológicamente importantes

Semirreacción	E'° (V)
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0,816
$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	0,771
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$	0,421
Citocromo f (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ citocromo f (Fe^{2+})	0,365
$Fe(CN)_6^{3-}$ (ferricianuro) + $e^- \rightarrow Fe(CN)_6^{4-}$	0,36
Citocromo a_3 (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ citocromo a_3 (Fe^{2+})	0,35
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	0,295
Citocromo a (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ citocromo a (Fe^{2+})	0,29
Citocromo c (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ citocromo c (Fe^{2+})	0,254
Citocromo c_1 (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ citocromo c_1 (Fe^{2+})	0,22
Citocromo b (Fe^{3+}) 1 $e^- \rightarrow$ citocromo b (Fe^{2+})	0,077
Ubiquinona + $2H^+ + 2e^-$ → ubiquinol	0,045
Fumarato^{2-} + $2H^+ + 2e^-$ → succinato^{2-}	0,031
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (en condiciones estándar, pH 0)	0,000
Crotonil-CoA + $2H^+ + 2e^-$ → butiril-CoA	−0,10
Oxalacetato^{2-} + $2H^+ + 2e^-$ → malato^{2-}	−0,166
Piruvato$^-$ + $2H^+ + 2e^-$ → lactato$^-$	−0,185
Acetaldehído + $2H^+ + 2e^-$ → etanol	−0,197
FAD + $2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$	−0,219[a]
Glutatión + $2H^+ + 2e^-$ → 2 glutatión reducido	−0,23
$S + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2S$	−0,243
Acido lipoico + $2H^+ + 2e^-$ → ácido dihidrolipoico	−0,29
$NAD^+ + H^+ + 2e^-$ → NADH	−0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^-$ → NADPH	−0,324
Acetoacetato + $2H^+ + 2e^-$ → β-hidroxibutirato	−0,346
α-Cetoglutarato + $CO_2 + 2H^+ + 2e^-$ → isocitrato	−0,38
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (a pH 7)	−0,414
Ferredoxina (Fe^{3+}) + e^- → ferredoxina (Fe^{2+})	−0,432

Fuente: Datos principalmente de Loach, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (G. D. Fasman, ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, p. 122, CRC Press, 1976.

[a] Este es el valor para el FAD libre; el FAD unido a una flavoproteína específica (por ej. succinato deshidrogenasa) posee un E'° diferente que depende del entorno de su proteína.

hído, etanol, NAD^+ y NADH están presentes a concentración 1,00 M.

Si, en cambio, el acetaldehído y NADH estuviesen presentes a concentración 1,00 M, pero el etanol y el NAD^+ lo estuviesen a 0,100 M, el valor de ΔG se calcularía usando la ecuación 13-4 y la variación de energía libre estándar calculada anteriormente:

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{etanol}][NAD^+]}{[\text{acetaldehído}][\text{NADH}]} \\ &= -23.7 \text{ kJ/mol} + \\ &\quad (8.315 \text{ J/mol·K})(298 \text{ K}) \ln \frac{(0.100 \text{ M})(0.100 \text{ M})}{(1.00 \text{ M})(1.00 \text{ M})} \\ &= -23.7 \text{ kJ/mol} + (2.48 \text{ J/mol}) \ln 0.01 \\ &= -35.1 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Ésta es la variación de energía libre real a las concentraciones especificadas de los pares redox.

La oxidación celular de glucosa a dióxido de carbono requiere transportadores de electrones especializados

Los principios de la energética de la oxidación-reducción antes descritos son aplicables a muchas reacciones metabólicas en las que intervienen transferencias de electrones. Por ejemplo, en muchos organismos, la oxidación de glucosa suministra energía para la producción de ATP. La oxidación completa de la glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

tiene una $\Delta G'^{\circ}$ de -2.840 kJ/mol. Ésta es una liberación de energía libre muy superior a la necesaria para la síntesis de ATP en las células (50 a 60 kJ/mol; véase el Ejemplo práctico 13-2). Las células no convierten la glucosa en CO_2 en una sola reacción con gran liberación de energía, sino que lo hacen en una serie de reacciones controladas, algunas de las cuales son oxidaciones. La energía libre desprendida en estos pasos de oxidación es del mismo orden de magnitud que la requerida para la síntesis de ATP a partir de ADP, con algo de energía de sobra. Los electrones eliminados en estos pasos oxidativos se transfieren a coenzimas especializados en el transporte de electrones, tales como el NAD^+ y el FAD (descritos a continuación).

Unos pocos tipos de coenzimas y proteínas actúan como transportadores universales de electrones

La multitud de enzimas que catalizan las oxidaciones celulares canalizan los electrones desde centenares de sustratos diferentes a sólo unos cuantos tipos de transportadores universales de electrones. La reducción de estos transportadores en los procesos catabólicos permite la conservación de la energía libre que se produce en la oxidación de los sustratos. El NAD, NADP, FMN y FAD son coenzimas hidrosolubles que experimentan oxidación y reducción reversibles en muchas de las reacciones de transferencia de electrones del metabolismo. Los nucleótidos NAD y NADP se trasladan fácilmente de un enzima a otro; los nucleótidos de flavina FMN y FAD están normalmente muy fuertemente uni-

COPY STATION

dos a los enzimas, denominados flavoproteínas, en los que actúan de grupo prostético. Las quinonas liposolubles tales como la ubiquinona y la plastoquinona actúan como transportadores de electrones y dadores de protones en el medio no acuoso de las membranas. Las proteínas ferro-sulfuradas y los citocromos, que tienen grupos prostéticos fuertemente unidos que experimentan oxidación y reducción reversibles, también actúan como transportadores de electrones en muchas reacciones de oxidación-reducción. Algunas de estas proteínas son hidrosolubles, pero otras son proteínas periféricas o integrales de membrana (véase la Fig. 11-6).

Concluiremos este capítulo describiendo algunas características químicas de los coenzimas nucleotídicos y de algunos de los enzimas (deshidrogenasas y flavoproteínas) que los utilizan. La química de oxidación-reducción de las quinonas, proteínas ferro-sulfuradas y citocromos se trata en los Capítulos 19 y 20.

El NADH y el NADPH actúan con las deshidrogenasas como transportadores solubles de electrones

El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD; NAD^+ en su forma oxidada) y su análogo próximo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP; $NADP^+$ en su forma oxidada) están compuestos por dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfato por un enlace fosfoanhídrido **(Fig. 13-24a)**. Debido a que el anillo de nicotinamida se parece a la piridina, a estos compuestos se les llama a veces **nucleótidos de piridina**. La vitamina niacina (factor PP o preventivo de la pelagra) aporta la porción de nicotinamida de los nucleótidos de nicotinamida.

Ambos coenzimas experimentan reducción reversible del anillo de la nicotinamida (Fig. 13-24). Mientras una molécula de sustrato es oxidada (deshidrogenación), cediendo dos átomos de hidrógeno, la forma oxidada del nucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) acepta un ión hidruro ($:H^-$, el equivalente de un protón y dos electrones) y se transforma en la forma reducida (NADH o NADPH). El segundo protón eliminado del sustrato se libera al disolvente acuoso. Las semirreacciones para estos cofactores nucleotídicos son

$$NAD^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADH + H^+$$
$$NADP^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADPH + H^+$$

La reducción de NAD^+ o $NADP^+$ convierte el anillo bencenoide de la porción nicotinamida (con una carga positiva fija sobre el nitrógeno del anillo) en la forma quinonoide (sin carga en el nitrógeno). Los nucleótidos reducidos absorben luz a 340 nm; las formas oxidadas no la absorben (Fig. 13-24b); esta diferencia en la absorción es utilizada por los bioquímicos para seguir reacciones en las que intervienen estos coenzimas. Observe que el signo positivo de las abreviaturas NAD^+ y $NADP^+$ *no* indica la carga neta de estas moléculas (de hecho, ambas están cargadas negativamente); indican que el anillo de nicotinamida está en su forma oxidada, con una carga positiva sobre el átomo de nitrógeno. En las abreviaturas NADH y NADPH, la "H" indica el ión hidruro añadido. Para referirnos a estos nucleótidos sin especificar su estado de oxidación utilizaremos NAD y NADP.

La concentración total de NAD^+ + NADH en la mayoría de tejidos es alrededor de 10^{-5} M; la de $NADP^+$ + NADPH es de alrededor de 10^{-6} M. En muchas células y

Copyrighted material

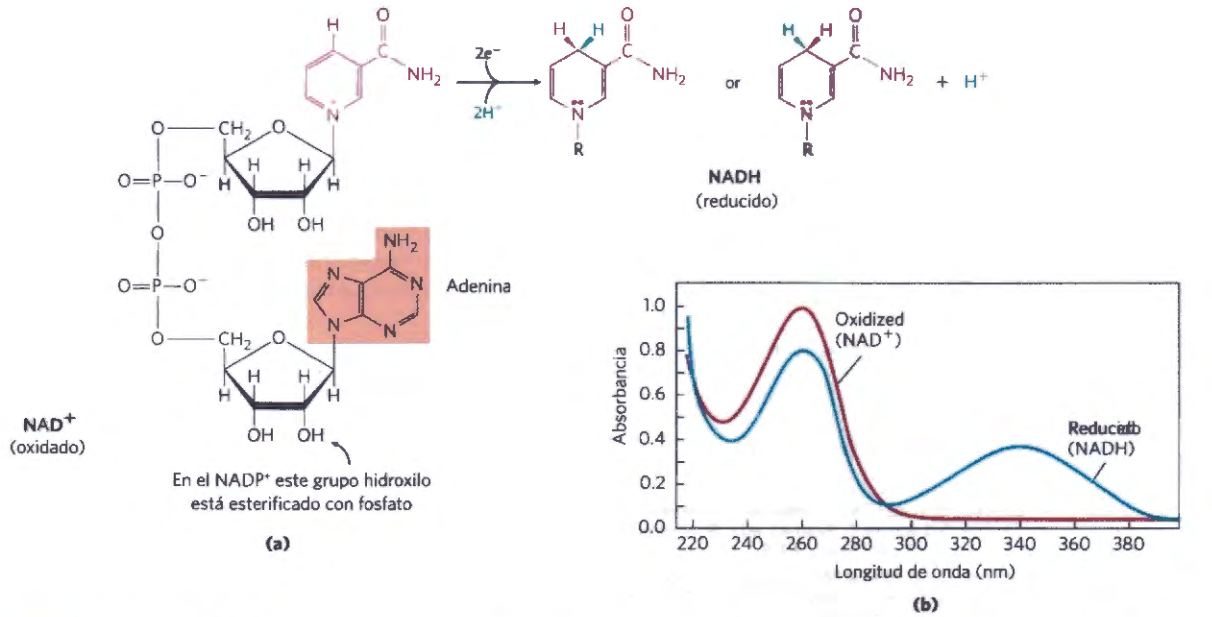


FIGURA 13-24 NAD y NADP. **(a)** El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y su análogo fosforilado $NADP^+$ se reducen a NADH y NADPH, aceptando un ión hidruro (dos electrones y un protón) a partir de un sustrato oxidable. El ión hidruro se puede adicionar en la parte frontal o posterior del anillo plano de la nicotinamida (véase la Tabla 13-8). **(b)** Espectro de absorción UV del NAD^+ y del NADH. La reducción del anillo de nicotinamida produce una nueva banda de absorción ancha con un máximo a 340 nm. La producción de NADH durante una reacción catalizada enzimáticamente puede seguirse de forma conveniente observando la aparición de la absorbancia a 340 nm; (el coeficiente de extinción molar $\varepsilon_{340} = 6.200\ M^{-1}cm^{-1}$).

tejidos, la proporción NAD^+ (oxidado) a NADH (reducido) es elevada, favoreciendo la transferencia de hidruro *hacia* el NAD^+ para formar NADH. Por el contrario, el NADPH está presente generalmente en concentración más elevada que su forma oxidada, $NADP^+$, lo que favorece la transferencia de hidruro *desde* el NADPH a un sustrato. Esto refleja los papeles metabólicos especializados de los dos coenzimas: el NAD^+ generalmente funciona en oxidaciones, normalmente como parte de una reacción catabólica; y el NADPH es el coenzima habitual en las reducciones, casi siempre como parte de una reacción anabólica. Unos pocos enzimas pueden utilizar cualquiera de los dos coenzimas, pero la mayoría muestran una preferencia clara por uno sobre el otro. Los procesos en los que actúan estos dos cofactores también están segregados en las células eucarióticas: por ejemplo, las oxidaciones de combustibles tales como el piruvato, ácidos grasos y α-cetoácidos procedentes de aminoácidos tienen lugar en la matriz mitocondrial, mientras que los procesos de biosíntesis reductora tales como la síntesis de ácidos grasos tienen lugar en el citosol. Esta especialización funcional y espacial permite que una célula mantenga dos reservas ("pools") distintas de transportadores de electrones, con dos funciones distintas.

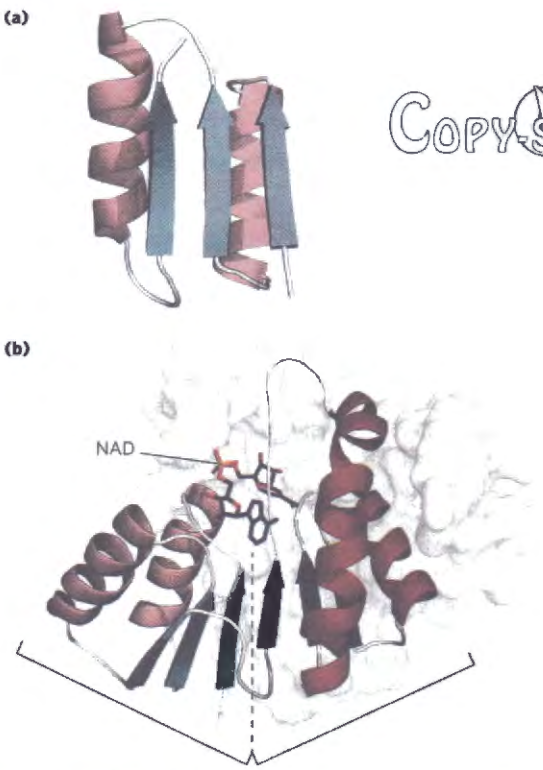


FIGURA 13-25 Pliegue de Rossman. Este motivo estructural se encuentra en el sitio de fijación de NAD de muchas deshidrogenasas. **(a)** Está formado por un par de motivos estructuralmente similares (de los que aquí sólo se muestra uno), cada uno con tres hojas β paralelas y dos hélices α (β-α-β-α-β). **(b)** Dominio de fijación de nucleótido del enzima lactato deshidrogenasa con el NAD (estructura de bolas y varillas) unido en una conformación extendida a través de puentes de hidrógeno y enlaces salinos a los motivos apareados β-α-β-α-β del pliegue de Rossman (tonos rojos y azules). [Fuente: Procedente de PDB ID 3LDH, J. L. White et al., *J. Mol. Biol.* 102:759, 1976.]

Se conocen más de 200 enzimas que catalizan reacciones en las que el NAD^+ (o el $NADP^+$) aceptan un ión hidruro desde algún sustrato reducido, o en el que el NADPH (o el NADH) donan un ión hidruro a un sustrato oxidado. Las reacciones generales son

$$AH_2 + NAD^+ \longrightarrow A + NADH + H^+$$
$$A + NADPH + H^+ \longrightarrow AH_2 + NADP^+$$

en donde AH_2 es el sustrato reducido y A el sustrato oxidado. El nombre general para los enzimas de este tipo es **oxidorreductasa**; también se les denomina habitualmente deshidrogenasas. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa cataliza el primer paso en el catabolismo del etanol, en el que éste es oxidado a acetaldehído:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Obsérvese que uno de los átomos de carbono del etanol ha perdido un hidrógeno; el compuesto ha sido oxidado de alcohol a aldehído (véase una vez más la Fig. 13-22 para los estados de oxidación del carbono).

La mayoría de deshidrogenasas que utilizan NAD o NADP unen el cofactor en un dominio proteico conservado denominado pliegue de Rossmann (de Michael Rossmann que dedujo la estructura de la lactato deshidrogenasa y describió por primera vez este motivo estructural). El pliegue de Rossmann consta normalmente de una hoja β paralela de seis cadenas y cuatro hélices α asociadas **(Fig. 13-25)**.

La asociación entre una deshidrogenasa y el NAD o NADP es relativamente débil; el coenzima difunde fácilmente desde un enzima a otro, actuando como transportador de electrones hidrosoluble desde un metabolito a otro. Por ejemplo, en la producción de alcohol durante la fermentación de la glucosa por las células de levadura, se elimina un ión hidruro del gliceraldehído 3-fosfato por un enzima (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, un enzima de tipo B) y se transfiere al NAD^+. El NADH producido abandona la superficie del enzima y difunde a otro enzima (alcohol deshidrogenasa, un enzima de tipo A), el cual transfiere un ión hidruro al acetaldehído, produciendo etanol:

$$\text{(1)}\quad \text{Gliceraldehído 3-fosfato} + NAD^+ \longrightarrow \text{3-fosfoglicerato} + NADH + H^+$$
$$\text{(2)}\quad \text{Acetaldehído} + NADH + H^+ \longrightarrow \text{etanol} + NAD^+$$
$$\textit{Suma:}\ \text{Gliceraldehído 3-fosfato} + \text{acetaldehído} \longrightarrow \text{3-fosfoglicerato} + \text{etanol}$$

Obsérvese que en la reacción global no hay producción o consumo neto de NAD^+ o NADH; los coenzimas funcionan catalíticamente, y se reciclan de forma repetida sin cambio neto en la concentración de NAD^+ + NADH.

Tanto las formas reducida y oxidad de NAD y NADP actúan como efectores alostéricos de proteínas en rutas catabólicas. Tal como se describe en capítulos posteriores, las razones NAD^+/NADH y $NADP^+$/NADPH actúan como indicadores sensibles del suministro de combustible de una célula lo que permite cambios rápidos y adecuados en el metabolismo productor o dependiente de energía.

COPY-STATION

Además de la transferencia electrónica el NAD tiene otras funciones importantes

Algunas funciones celulares clave están reguladas por enzimas que utilizan NAD^+ no como un cofactor redox sino como sustrato en una reacción acoplada en la que la disponibilidad de NAD^+ puede ser un indicador del estatus energético celular. En la replicación y reparación del DNA, el enzima DNA ligasa está adenililado y, a continuación, transfiere el AMP al 5'-fosfato en un DNA mellado (véase la Fig. 25-16); en bacterias, el NAD^+ actúa como fuente del grupo AMP activador. Una familia de proteínas denominadas sirtuínas regulan la actividad de proteínas en diversas rutas celulares mediante la desacetilación del grupo ε-amino de un residuo Lys acetilado. La desacetilación está ligada a hidrólisis de NAD^+, lo que rinde *O*-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida. Entre los procesos celulares regulados por las sirtuínas se encuentran la inflamación, apoptosis, envejecimiento y transcripción del DNA; la desacetilación por una sirtuína altera la carga en las histonas, lo que influye sobre qué genes se expresan (véase la p. 1149). La disponibilidad de NAD^+ para estos tipos de reacciones puede indicar que la célula está sometida a estrés por lo que se han de activar las rutas diseñadas para responder al estrés.

El NAD^+ también juega un papel importante en las infecciones de cólera (véase el Recuadro 12-1). La toxina del cólera tiene una actividad enzimática que transfiere ADP-ribosa desde el NAD^+ a una proteína G involucrada en la regulación de flujos iónicos en las células que tapizan el intestino. Esta ADP-ribosilación bloquea la retención de agua, provocando la diarrea y deshidratación características del cólera. ■

La carencia de niacina, forma vitamínica del NAD y del NADP, en la dieta produce pelagra

Tal como se observó en el Capítulo 6, y continuaremos discutiendo en capítulos posteriores, la mayoría de coenzimas provienen de sustancias llamadas vitaminas. Los anillos tipo piridina del NAD y del NADP provienen de la vitamina **niacina** (ácido nicotínico; **Fig. 13-26**) que se sintetiza a partir del triptófano. El hombre generalmente no puede sintetizar niacina en cantidad suficiente, en especial los individuos que consumen dietas pobres en triptófano (el maíz, por ejemplo, tiene un bajo contenido en triptófano). La carencia de niacina, que afecta a todas las deshidrogenasas dependientes de NAD(P) es causa de la grave enfermedad humana pelagra (del italiano "piel rugosa") y una enfermedad relacionada de los perros denominada lengua negra. La pelagra se caracteriza por las "tres D": dermatitis, diarrea y demencia, seguidas en muchos casos por la muerte. Hace un siglo, la pelagra era una enfermedad humana común; en el sur de los Estados Unidos en donde el maíz era un componente básico de la dieta había unas 100.000 personas afectadas y alrededor de 10.000 murieron como resultado de esta enfermedad entre 1912 y 1916. En 1920 Joseph Goldberger demostró que la pelagra era debida a una insuficiencia en la dieta y en 1937 Frank Strong, D. Wayne Woolley y Conrad Elvehjem identificaron la niacina como agente curativo de la lengua negra. La suplementación de la dieta humana con este económico compuesto ha casi erradicado la pelagra en las poblaciones del mundo desarrollado, con una excepción significativa: la gente que bebe cantidades excesivas de alcohol. En estos individuos la absorción intestinal de niacina está muy reducida y sus necesidades calóricas están satisfechas, a menudo, con licores destilados que carecen, prácticamente, de vitaminas entre ellas la niacina. ■



Frank Strong, 1908-1993 [Fuente: Cortesía del Departamento de Bioquímica, University of Wisconsin-Madison.]



D. Wayne Woolley, 1914-1966 [Fuente: Rockefeller Archive Center.]



Conrad Elvehjem, 1901-1962 [Fuente: Cortesía del Departamento de Bioquímica de la University of Wisconsin-Madison.]

COPY-STATION

Los nucleótidos de flavina están fuertemente unidos en las flavoproteínas

Las **flavoproteínas** son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción utilizando flavina mononucleótido (FMN) o flavina adenina dinucleótido (FAD) como coenzima **(Fig. 13-27)**. Estos coenzimas, los **nucleótidos de flavina,** provienen de la vitamina riboflavina. La estructura de anillos fusionados de los nucleótidos de flavina (el anillo isoaloxazina) se reduce de manera reversible, aceptando uno o dos electrones en forma de uno o dos átomos de hidrógeno (cada átomo consiste en un electrón más un protón) desde un sustrato reducido. Las formas completamente reducidas se abrevian $FMNH_2$ y $FADH_2$. Cuando un nucleótido de flavina totalmente oxidado acepta sólo un electrón (un átomo de hidrógeno), se produce la forma semiquinona del anillo de isoaloxazina, abreviada $FADH_\bullet$ y $FMNH_\bullet$. Debido a que lo nucleótidos de flavina tienen una especialidad química algo diferente de la de los coenzimas de nicotinamida, la capacidad de participar tanto en transferencias de uno como de dos electrones, las flavoproteínas interviene en una mayor variedad de reacciones que las deshidrogenasas ligadas a NAD**(P)**.

Al igual que los coenzimas de nicotinamida (Fig. 13-24), cuando se reducen los nucleótidos de flavina experimentan un desplazamiento de una banda de absorción principal (también útil para los bioquímicos que desean seguir reacciones en las que intervienen estos coenzimas). Las flavoproteínas totalmente reducidas (dos electrones aceptados) tienen generalmente un máximo de absorción cerca de 360 nm. Cuando están

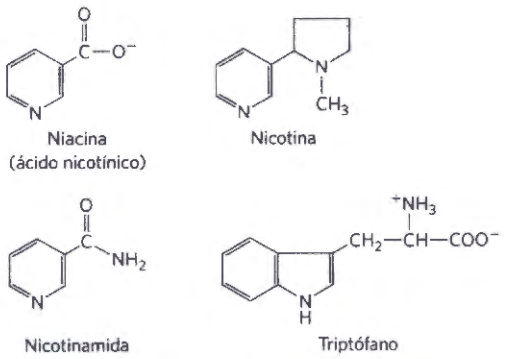


FIGURA 13-26 Estructuras de la niacina (ácido nicotínico) y su derivado nicotinamida. El precursor biosintético de estos compuestos es el triptófano. En el laboratorio el ácido nicotínico se obtuvo por primera vez por oxidación del producto natural nicotina (de ahí el nombre). Tanto el ácido nicotínico como la nicotinamida curan la pelagra, pero la nicotina (de los cigarrillos o de otro origen) no tiene actividad curativa.

parcialmente reducidas (un electrón) adquieren otro máximo de absorción alrededor de 450 nm; cuando están totalmente oxidadas, la flavina tiene un máximo entre 370 y 440 nm.

El nucleótido de flavina en la mayoría de flavoproteínas está unido fuertemente a la proteína, y en algunos enzimas, tales como la succinato deshidrogenasa, lo está de manera covalente. Estos coenzimas fuertemente unidos se denominan propiamente grupos prostéticos. No transfieren electrones difundiendo desde un enzima a otro; en lugar de ello, proporcionan un medio por el que la flavoproteína puede retener temporalmente electrones mientras cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato reducido a un aceptor de electrones. Una característica importante de las flavoproteínas es la variabilidad en el potencial de reducción estándar (E'°) del nucleótido de flavina ligado. La fuerte asociación entre el enzima y el grupo prostético confiere al anillo de flavina un potencial de reducción típico de aquella flavoproteína en particular que es, a veces, muy diferente del potencial de reducción del nucleótido de flavina libre. El FAD unido a la succinato deshidrogenasa, por ejemplo, posee un E'° cercano a 0,0 V, en comparación con -0,219 V para el FAD libre. El E'° para otras flavoproteínas va desde –0,40 V a +0,06 V. Las flavoproteínas son, frecuentemente, muy complejas; algunas tienen, además de un nucleótido de flavina, iones inorgánicos fuertemente unidos (hierro o molibdeno, por ejemplo) que pueden participar en transferencias de electrones.

Ciertas flavoproteínas tienen un papel claramente diferente como receptores de luz. Los **criptocromos** son una familia de flavoproteínas ampliamente distribuida en los phyla eucarióticos que intervienen en los efectos de la luz azul sobre el desarrollo de las plantas y los efectos de la luz sobre los ritmos circadianos (oscilaciones en fisiología y bioquímica con un período de 24 horas) de los mamíferos. Los criptocromos son homólogos de otra familia de flavoproteínas denominadas fotoliasas. Presentes tanto en bacterias como en eucariotas, las **fotoliasas** utilizan la energía absorbida de la luz para reparar defectos del DNA.

La función de las flavoproteínas como transportadores de electrones la examinaremos en los Capítulos 19 y 20 en los que consideraremos sus papeles en la fosforilación oxidativa (en las mitocondrias) y en la fotofosforilación (en los cloroplastos) mientras que describiremos las reacciones de las fotoliasas en el Capítulo 25.

COPYSTATION

RESUMEN 13.4 Reacciones de oxidación-reducción biológicas

■ En muchos organismos un proceso central en la conservación de la energía es la oxidación por pasos de la glucosa a CO_2, en el que parte de la energía de oxida-

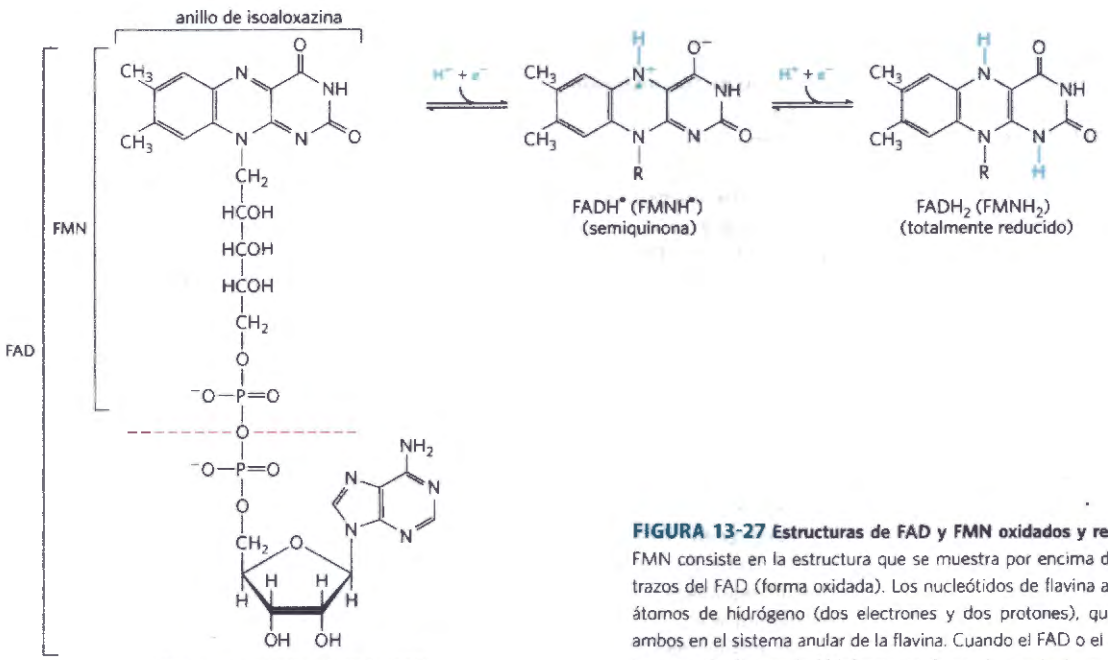


FIGURA 13-27 Estructuras de FAD y FMN oxidados y reducidos. El FMN consiste en la estructura que se muestra por encima de la línea a trazos del FAD (forma oxidada). Los nucleótidos de flavina aceptan dos átomos de hidrógeno (dos electrones y dos protones), que aparecen ambos en el sistema anular de la flavina. Cuando el FAD o el FMN aceptan un solo átomo de hidrógeno, se forma la semiquinona que es un radical libre estable.

ción se conserva en forma de ATP a medida que los electrones pasan al O_2.

- Las reacciones de oxidación-reducción biológicas se pueden describir en términos de dos semirreacciones, cada una de ellas con un potencial de reducción estándar característico, E'°.
- Cuando se conectan dos semiceldas electroquímicas, cada una de ellas con los componentes de una semirreacción, los electrones tienen una tendencia a fluir desde la semicelda con el potencial de reducción más elevado. La fuerza de esta tendencia es proporcional a la diferencia entre los dos potenciales de reducción (ΔE) y es función de la concentración de las especies oxidadas y reducidas.
- La variación de energía libre estándar de una reacción de oxidación-reducción es directamente proporcional a la diferencia en los potenciales de reducción estándar de las dos semiceldas: $\Delta G'^{\circ} = -nF\Delta E'^{\circ}$.
- Muchas reacciones de oxidación biológicas son deshidrogenaciones en las que se transfieren uno o dos átomos de hidrógeno ($H^+ + e^-$) desde un sustrato a un aceptor de hidrógeno. En las reacciones de oxidación-reducción en las células vivas intervienen transportadores de electrones especializados.
- El NAD y el NADP son los coenzimas de difusión libre de muchas deshidrogenasas. Tanto el NAD^+ como el $NADP^+$ aceptan dos electrones y un protón. Además de su papel en reacciones de oxidación-reducción, el NAD^+ es la fuente de AMP en la reacción de la AMP-ligasa bacteriana, de ADP-ribosa en la reacción de la toxina colérica y se hidroliza en la reacción de desacetilación de proteínas por alguna sirtuínas.
- El FAD y el FMN, los nucleótidos de flavina, constituyen los grupos prostéticos fuertemente unidos de las flavoproteínas. Pueden aceptar tanto uno como dos electrones y uno o dos protones. Las flavoproteínas también sirven como receptores de luz en los criptocromos y en las fotoliasas.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

Autótrofo 491
heterótrofo 491
metabolismo 492
rutas metabólicas 492
metabolito 492
metabolismo intermediario 492
catabolismo 492
anabolismo 492
constantes estándar transformadas 497
rotura homolítica 502
radical 502
rotura heterolítica 502
nucleófilo 502
electrófilo 502
carbanión 502
carbocatión 502
condensación aldólica 503
condensación de Claisen 503
potencial de fosforilación (ΔG_p) 507
tioéster 510
adenililación 513
pirofosfato inorgánico hidrolasa 513
nucleósido difosfato quinasa 514
adenilato quinasa 515
creatina quinasa 515
fosfágenos 516
polifosfato quinasa-1, quinasa -2 516
fuerza electromotriz (fem) 518
par redox conjugado 519
deshidrogenación 519
deshidrogenasas 519
equivalente de reducción 519
potencial de reducción estándar (E'_o) 519
nucleótido de piridina 522
oxidorreductasa 523
flavoproteína 524
nucleótidos de flavina 524
criptocromo 525
fotoliasa 525

Problemas

1. Cambios de entropía durante el desarrollo del huevo Consideremos un sistema que consiste en un huevo en una incubadora. La clara y la yema del huevo contienen proteínas, glúcidos y lípidos. Si el huevo se fertiliza, se transforma desde una sola célula en un organismo complejo. Discuta este proceso irreversible en términos de cambios de entropía en el sistema, el ambiente circundante y el universo. Asegúrese de que en primer lugar define claramente el sistema y su entorno.

2. Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$ a partir de constantes de equilibrio Calcule la variación de energía libre estándar de las siguientes reacciones metabólicamente importantes, catalizadas por enzimas, a 25 °C y pH 7,0 a partir de las constantes de equilibrio dadas.

(a) Glutamato + oxalacetato $\rightleftharpoons$ aspartato + α-cetoglutarato $K'_{eq} = 6{,}8$

(b) Dihidroxiacetona fosfato $\rightleftharpoons$ gliceraldehído 3-fosfato $K'_{eq} = 0{,}0475$

(c) Fructosa 6-fosfato + ATP $\rightleftharpoons$ fructosa 1,6-bisfosfato + ADP $K'_{eq} = 254$

COPY-STATION

3. Cálculo de la constante de equilibrio a partir de $\Delta G'^{\circ}$ Calcule la constante de equilibrio K'_{eq} de cada una de las siguientes reacciones a pH 7,0 y 25 °C, utilizando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de la Tabla 13-4:

(a) Glucosa 6-fosfato + H_2O $\rightleftharpoons$ glucosa + P_i

(b) Lactosa + H_2O $\rightleftharpoons$ glucosa + galactosa

(c) Malato $\rightleftharpoons$ fumarato + H_2O

4. Determinación experimental de K'_{eq} y $\Delta G'_o$ Si se incuba una disolución 0,1 M de glucosa 1-fosfato a 25 °C con una cantidad catalítica de fosfoglucomutasa, la glucosa 1-fosfato se transforma en glucosa 6-fosfato. En el equilibrio, las concentraciones de los componentes de la reacción son

Glucosa 1-fosfato $\rightleftharpoons$ glucosa 6-fosfato
$4{,}5 \times 10^{-3}$ M $\quad$ $9{,}6 \times 10^{-2}$ M

Calcule K'_{eq} y $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción.

5. Determinación experimental de $\Delta G'_o$ para la hidrólisis del ATP La medición directa de la variación de energía libre estándar asociada a la hidrólisis del ATP es técnicamente complicada ya que la pequeña cantidad de ATP que resta en el equilibrio es difícil de medir con precisión. No obstante, se puede calcular indirectamente el valor de $\Delta G'^{\circ}$ a partir de las constantes de equilibrio de otras dos reacciones enzimáticas que tienen constantes de equilibrio menos favorables:

Glucosa 6-fosfato + H_2O ⟶ glucosa + P_i $K'_{eq} = 270$

ATP + glucosa ⟶ ADP + glucosa 6-fosfato $K'_{eq} = 890$

Utilizando esta información sobre las constantes de equilibrio determinadas a 25 °C, calcule la energía libre estándar de hidrólisis del ATP.

6. Diferencia entre $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG Considere la interconversión siguiente, que tiene lugar en la glucólisis (Capítulo 14):

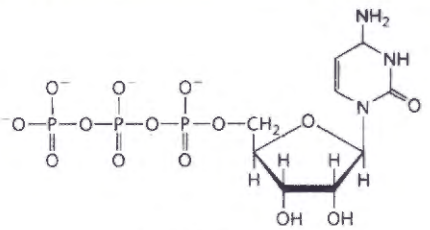
Fructosa 6-fosfato ⟷ glucosa 6-fosfato $K'_{eq} = 1{,}97$

(a) ¿Cuál es la $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción (K'_{eq} determinada a 25 °C)?

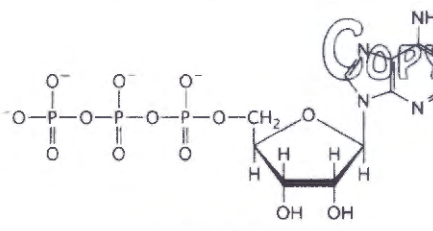
(b) Si se ajusta la concentración de fructosa 6-fosfato a 1,5 M y la de la glucosa 6-fosfato se ajusta a 0,50 M, ¿cuál es el valor de ΔG?

(c) ¿Por qué $\Delta G'^{\circ}$ y ΔG son diferentes?

7. Energía libre de hidrólisis del CTP Compare la estructura del nucleósido trifosfato CTP con la estructura del ATP.



Citidina trifosfato (CTP)



Adenosina trifosfato (ATP)

Ahora prediga la K'_{eq} y la $\Delta G'^{\circ}$ de la siguiente reacción:

ATP + CDP ⟶ ADP + CTP

8. Dependencia de ΔG respecto al pH La energía libre desprendida en la hidrólisis del ATP en condiciones estándar es -30,5 kJ/mol. Si el ATP se hidroliza en condiciones estándar excepto que el pH es 5,0 ¿se desprende más o menos energía libre? Explíquelo.

9. $\Delta G'^{\circ}$ de reacciones acopladas La glucosa 1-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato en dos reacciones sucesivas:

Glucosa 1-fosfato ⟶ glucosa 6-fosfato

Glucosa 6-fosfato ⟶ fructosa 6-fosfato

Utilizando los valores de $\Delta G'^{\circ}$ de la Tabla 13-4, calcule la constante de equilibrio, K'_{eq} de la suma de las dos reacciones:

Glucosa 1-fosfato ⟶ fructosa 6-fosfato

10 Efecto de la razón [ATP]/[ADP] sobre la energía libre de hidrólisis del ATP Utilizando la Ecuación 13-4, represente ΔG frente ln Q (razón de acción de masas) a 25 °C para las concentraciones de ATP, ADP y P_i de la tabla siguiente. $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción es -30,5 kJ/mol. Utilice la gráfica resultante para explicar por qué está regulado el metabolismo para que se mantenga una razón [ATP]/[ADP] elevada.

	Concentración (mM)				
ATP	5	3	1	0.2	5
ADP	0.2	2.2	4.2	5.0	25
P_i	10	12.1	14.1	14.9	10

11. Estrategia para superar una reacción desfavorable: acoplamiento químico dependiente del ATP La fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato es el paso inicial en el catabolismo de la glucosa. La fosforilación directa de la glucosa por el P_i se describe mediante la ecuación

Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato + H_2O

$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8$ kJ/mol

(a) Calcule la constante de equilibrio de la reacción anterior a 37 °C. En el hepatocito de rata las concentraciones fisiológicas de glucosa y P_i se mantienen aproximadamente en 4,8 mM. ¿Cuál es la concentración de equilibrio de la glucosa 6-fosfato obtenida por la fosforilación directa de la glucosa por el P_i? ¿Representa esta reacción un paso metabólico razonable para el catabolismo de la glucosa? Explíquelo.

(b) En principio, al menos, una forma de aumentar la concentración de glucosa 6-fosfato es impulsar la reacción de equilibrio hacia la derecha mediante el aumento de las concentraciones intracelulares de glucosa y P_i. Suponiendo una concentración fija de P_i de 4,8 mM, ¿qué valor habría de alcanzar la concentración intracelular de glucosa para tener una concentración de equilibrio de glucosa 6-fosfato de 250 μM (concentración fisiológica normal)? ¿Sería esta ruta fisiológicamente razonable dado que la solubilidad máxima de la glucosa es inferior a 1 M?

(c) La fosforilación de la glucosa en la célula está acoplada a la hidrólisis del ATP; esto es, parte de la energía libre de hidrólisis del ATP se utiliza para fosforilar la glucosa:

(1) Glucosa + P_i ⟶ glucosa 6-fosfato + H_2O $\Delta G'^{\circ} = 13{,}8$ kJ/mol

(2) ATP + H_2O ⟶ ADP + P_i $\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$ kJ/mol

Suma: Glucosa + ATP ⟶ glucosa 6-fosfato + ADP

Calcule K'_{eq} a 37 °C de la reacción global. Cuando se lleva a cabo la fosforilación de la glucosa dependiente de ATP, ¿qué concentración de glucosa es necesaria para conseguir una concentración intracelular 250 μM de glucosa 6-fosfato cuando las concentraciones de ATP y ADP son 3,38 mM y 1,32 mM, respectivamente? ¿Proporciona este proceso de acoplamiento una ruta factible, al menos en principio, para la fosforilación de la glucosa en la célula? Explíquelo.

(d) Aunque el acoplamiento de la hidrólisis del ATP a la fosforilación de la glucosa tiene sentido termodinámicamente, aún no se ha especificado de qué forma tiene lugar dicho acoplamiento. Dado que el acoplamiento precisa de un intermediario común, una ruta posible sería utilizar la hidrólisis del ATP para aumentar la concentración intracelular de P_i e impulsar así la fosforilación desfavorable de la glucosa por el P_i. ¿Sería esto una ruta razonable? (Piense en los productos de solubilidad de los intermediarios metabólicos.)

(e) La fosforilación de la glucosa acoplada al ATP está catalizada en los hepatocitos por el enzima glucoquinasa. Este enzima une ATP y glucosa formando un complejo glucosa-ATP-enzima, y el grupo fosforilo se transfiere directa-

COPY-STATION

mente desde el ATP a la glucosa. Explique las ventajas de esta ruta.

12. Cálculo de $\Delta G'$, de reacciones acopladas al ATP A partir de los datos de la Tabla 13-6 calcule el valor de $\Delta G'^{\circ}$ de las reacciones siguientes.

(a) Fosfocreatina + ADP ⟶ creatina + ATP
(b) ATP + fructosa ⟶ ADP + fructosa 6-fosfato

13. Acoplamiento de la rotura del ATP a una reacción desfavorable Para explorar las consecuencias de acoplar la hidrólisis del ATP en condiciones fisiológicas a una reacción bioquímica termodinámicamente desfavorable, considere la transformación hipotética X ⟶ Y, para la que $\Delta G'^{\circ} = 20{,}0$ kJ/mol.

(a) ¿Cuál es la proporción [Y]/[X] en el equilibrio?

(b) Supongamos que X e Y participan en una secuencia de reacciones durante las que el ATP se hidroliza a ADP y P_i. La reacción global es

$$X + ATP + H_2O \longrightarrow Y + ADP + P_i$$

Calcule [Y]/[X] de esta reacción en el equilibrio. Suponga que la temperatura es 25 °C y las concentraciones de ATP, ADP y P_i son 1 M cuando la reacción está en el equilibrio.

(c) Sabemos que [ATP], [ADP] y [P_i] *no* son 1M en condiciones fisiológicas. Calcule [Y]/[X] para la reacción acoplada al ATP cuando los valores de [ATP], [ADP] y [P_i] son los que se encuentran en los miocitos de rata (Tabla 13-5).

14. Cálculo de ΔG a concentraciones fisiológicas Calcule la ΔG real, fisiológica, de la reacción

Fosfocreatina + ADP ⟶ creatina + ATP

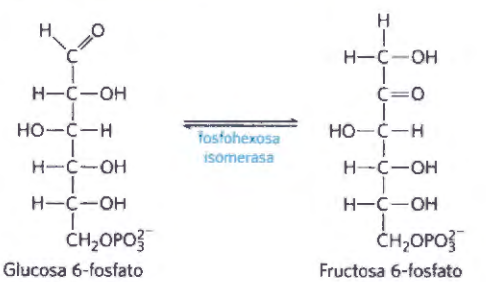
a 37 °C tal como se da en el citosol de las neuronas, en el que la fosfocreatina está presente a concentración 4,7 mM, la creatina a 1,0 mM, el ADP a 0,73 mM y el ATP a 2,6 mM.

15. Energía libre necesaria para la síntesis de ATP en condiciones fisiológicas En el citosol de los hepatocitos de rata, la temperatura es 37 °C y el cociente de acción de masas, Q, es

$$\frac{[ATP]}{[ADP]\,[Pi]} = 5{,}33 \times 10^2\ \text{M}^{-1}$$

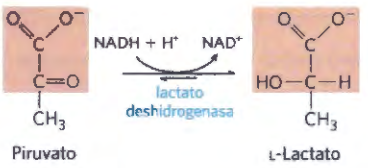
Calcule la energía libre requerida para sintetizar ATP en el hepatocito de rata.

16. Lógica química En la ruta glucolítica, se rompe un azúcar de seis carbonos (fructosa 1,6-bisfosfato) formando dos azúcares de tres carbonos, que son metabolizados a continuación (véase la Fig. 14-6). En esta ruta tiene lugar una isomerización de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato (mostrada a continuación) dos pasos antes de la reacción de rotura (la etapa interpuesta es la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato



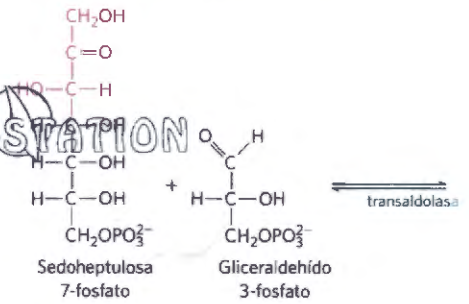
¿Qué consigue el paso de isomerización desde la perspectiva química? (Pista: Considere qué podría suceder si la rotura del enlace C-C tuviese lugar sin la isomerización precedente)

17. Mecanismos de reacción enzimáticos I La lactato deshidrogenasa es uno de los múltiples enzimas que requieren NADH como coenzima. Cataliza la conversión del piruvato en lactato:

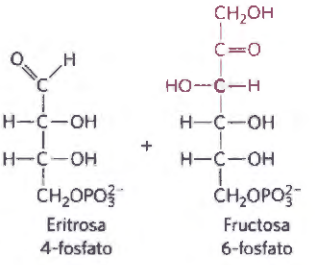


Dibuje el mecanismo de esta reacción (muestre las flechas de desplazamiento de electrones). (Pista: Esta es una reacción común a lo largo de todo el metabolismo; el mecanismo es similar al catalizado por otras deshidrogenasas que utilizan NADH, como por ejemplo la alcohol deshidrogenasa).

18. Mecanismos de reacción enzimáticos II Las reacciones bioquímicas a menudo parecen más complejas de lo que lo son en realidad. En la vía de las pentosas fosfato (Capítulo 14), la sedoheptulosa 7-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato reaccionan formando eritrosa 4-fosfato y fructosa 6-fosfato en una reacción catalizada por la transaldolasa.

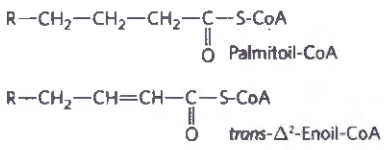


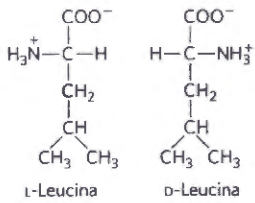
COPY-STATION

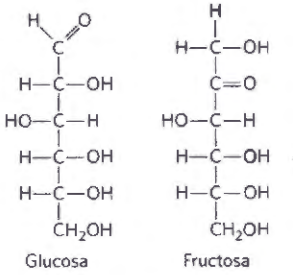


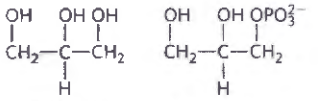
Escriba un mecanismo para esta reacción (muestre las flechas de desplazamiento de electrones). (Pista: Vuelva a echar un vistazo a las condensaciones aldólicas y, a continuación, considere el nombre del enzima)

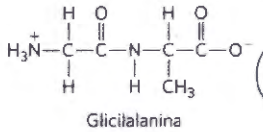
19. Reconocimiento de tipos de reacción Para los siguientes pares de biomoléculas, identifique los tipos de reacción (oxidación-reducción, hidrólisis, isomerización, transferencia de grupo o reordenamiento interno) necesario para convertir la primera molécula en la segunda. En cada caso indique el tipo general de enzima y cofactor(es) o reactivos que serían necesarios y cualquier otro producto que pueda producirse.

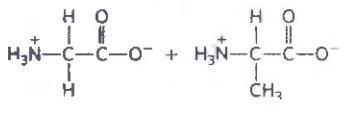


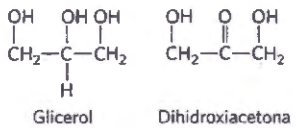


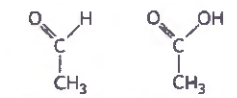




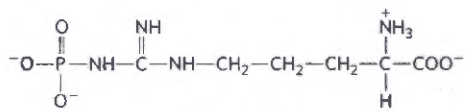








20. Efecto de la estructura sobre el potencial de transferencia de grupo Algunos invertebrados contienen fosfoarginina. ¿Es la energía libre estándar de hidrólisis de esta molécula más parecida a la de la glucosa 6-fosfato o a la del ATP? Explique su respuesta.



21. Polifosfato como posible fuente de energía La energía libre estándar de hidrólisis del polifosfato inorgánico (poliP) es de alrededor de -20 kJ/mol por cada P_i liberado. Calculamos en el Ejemplo práctico 13-2 que, en una célula, se necesitan unos 50 kJ/mol de energía para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i. ¿Es posible que una célula utilice polifosfato para sintetizar ATP a partir de ADP? Explique su respuesta.

22. Utilización diaria de ATP por los seres humanos adultos

(a) Se necesita un total de 30,5 kJ/mol de energía libre para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i cuando reactivos y productos se encuentran a concentración 1 M y la temperatura es 25 °C (estado estándar). Debido a que las concentraciones fisiológicas reales de ATP, ADP y P_i no son 1M y la temperatura es 37 °C, la energía libre requerida para sintetizar ATP en condiciones fisiológicas es diferente de $\Delta G'^{\circ}$. Calcule la energía libre requerida para sintetizar ATP en el hepatocito humano cuando las concentraciones fisiológicas de ATP, ADP y P_i son 3,5, 1,50 y 5,0 mM, respectivamente.

(b) Un adulto de 68 kg requiere una ingesta calórica de 2.000 kcal (8.360 kJ) de alimento por día (24 horas). Este alimento es metabolizado y se utiliza la energía libre para sintetizar ATP, el cual proporciona seguidamente energía para realizar el trabajo químico y mecánico diario del cuerpo. Suponiendo que la eficiencia de conversión de la energía del alimento en ATP sea del 50%, calcule el peso de ATP utilizado por un ser humano adulto en un período de 24 horas. ¿Qué porcentaje representa respecto al peso corporal?

(c) Aunque los adultos sintetizan diariamente grandes cantidades de ATP, su peso corporal, estructura y composición no cambian significativamente durante este período. Explique esta aparente contradicción.

23. Velocidades de recambio de los fosfatos γ- y β- del ATP Si se añade a un extracto de levadura una pequeña cantidad de ATP marcado con fósforo radiactivo en la posición terminal, [γ-^{32}P]ATP, alrededor de la mitad de la actividad ^{32}P se encuentra en el P_i al cabo de unos pocos minutos, aunque la concentración de ATP permanece inalterada. Explíquelo. Si se realiza el mismo experimento utilizando ATP marcado con ^{32}P en la posición central, [β-^{32}P]ATP, el ^{32}P no aparece en el P_i en un tiempo tan corto. ¿Por qué?

24. Escisión del ATP a AMP y PP_i durante el metabolismo La síntesis de la forma activada del acetato (acetil-CoA) se realiza en un proceso dependiente de ATP:

$$\text{Acetato} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

(a) La $\Delta G'^{\circ}$ para la hidrólisis del acetil-CoA a acetato y CoA es –32,2 kJ/mol y para la hidrólisis del ATP a AMP y PP_i es -30,5 kJ/mol. Calcule $\Delta G'^{\circ}$ para la síntesis de acetil-CoA dependiente de ATP.

(b) Casi todas las células contienen el enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa que cataliza la hidrólisis de PP_i a P_i. ¿Qué efecto tiene la presencia de este enzima sobre la síntesis de acetil-CoA? Explíquelo.

25. Energía para el bombeo de H^+ Las células parietales que recubren el estómago contienen "bombas" de membrana que transportan iones hidrógeno desde el citosol (pH 7,0) al estómago, contribuyendo a la acidez del jugo gástrico (pH 1,0). Calcule la energía libre requerida para transportar 1 mol de iones hidrógeno a través de estas bombas (Sugerencia: véase el Capítulo 11.) Suponga una temperatura de 37 °C.

26. Potenciales de reducción estándar El potencial de reducción estándar, E'°, de cualquier par redox viene definido por la reacción de semicelda:

COPY-STATION

Agente oxidante + n electrones ⟶ agente reductor

Los valores de E'° para los pares redox conjugados NAD^+/NADH y piruvato/lactato son -0,32 V y -0,19 V, respectivamente.

(a) ¿Cuál de los dos pares conjugados tiene mayor tendencia a perder electrones? Explíquelo.

(b) ¿Cuál es el agente oxidante más fuerte? Explíquelo.

(c) Si empezamos con concentraciones 1M de cada reactivo y producto a pH 7 y 25 °C, ¿en qué dirección transcurrirá la siguiente reacción?

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + NAD^+$$

(d) ¿Cuál es la variación de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ}$) para la conversión del piruvato en lactato?

(e) ¿Cuál es la constante de equilibrio (K'_{eq}) de esta reacción?

27. Extensión energética de la cadena respiratoria La transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial se puede representar mediante la ecuación de reacción neta

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

(a) Calcule el valor de $\Delta E'^{\circ}$ de la reacción neta de la transferencia electrónica mitocondrial. Utilice los valores de E'° de la Tabla 13-7.

(b) Calcule $\Delta G'^{\circ}$ de esta reacción.

(c) ¿Cuántas moléculas de ATP se pueden generar *teóricamente* por esta reacción si la energía libre de síntesis de ATP en condiciones celulares es 52 kJ/mol?

28. Dependencia de la fuerza electromotriz respecto a las concentraciones Calcule la fuerza electromotriz (en voltios) registrada por un electrodo inmerso en una solución que contiene las siguientes mezclas de NAD^+ y NADH a pH 7,0 y 25 °C, con referencia a una semicelda de E'° = 0,00 V.

(a) 1.0 mM NAD^+ and 10 mM NADH
(b) 1.0 mM NAD^+ and 1.0 mM NADH
(c) 10 mM NAD^+ and 1.0 mM NADH

29. Afinidad electrónica de los compuestos Ponga las siguientes sustancias en orden de tendencia creciente para aceptar electrones: (a) α-cetoglutarato + CO_2 (produciendo isocitrato), (b) oxalacetato, (c) O_2, (d) $NADP^+$.

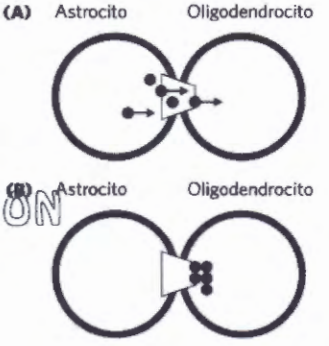
30. Dirección de las reacciones de oxidación-reducción ¿Cuál de las siguientes reacciones podría esperarse que transcurriese en la dirección mostrada, en condiciones estándar, en presencia de los enzimas apropiados?

(a) Malato + NAD^+ ⟶ oxalacetato + NADH + H^+
(b) Acetoacetato + NADH + H^+ ⟶ β-hidroxibutirato + NAD^+
(c) Piruvato + NADH + H^+ ⟶ lactato + NAD^+
(d) Piruvato + β-hidroxibutirato ⟶ lactato + acetoacetato
(e) Malato + piruvato ⟶ oxalacetato + lactato
(f) Acetaldehído + succinato ⟶ etanol + fumarato

Problema de análisis de Datos

31. La termodinámica puede ser complicada La termodinámica puede se un área de estudio complicada y con muchas oportunidades para la confusión. Un ejemplo interesante puede encontrarse en un artículo de Robinson, Hampson, Munro y Vaney, publicado en *Science* en 1993. Robinson y colaboradores estudiaron el desplazamiento de moléculas pequeñas entre células vecinas del sistema nervioso a través de canales intercelulares (uniones en hendidura). Encontraron que los colorantes amarillo Lucifer (una molécula pequeña cargada negativamente) y la biocitina (una molécula pequeña zwitteriónica) se desplazaban en una única dirección entre dos tipos concretos de glia (células no neuronales del sistema nervioso). El colorante inyectado en los astrocitos pasa rápidamente a astrocitos adyacentes, oligodendrocitos o células de Müller, pero el colorante inyectado en los oligodendrocitos o en células de Müller pasaba lentamente, si es que lo hacía, a los astrocitos. Todos estos tipos de células están conectadas por uniones en hendidura.

Aunque no era un punto central del artículo, los autores presentaron un modelo molecular sobre cómo podría tener lugar este transporte unidireccional, tal como se muestra en su Figura 3:



El pie de figura dice: "Modelo de la difusión unidireccional del colorante entre oligodendrocitos y astrocitos acoplados, basado en diferencias del diámetro del poro de conexión. Al igual que un pez en una nasa, las moléculas de colorante (círculos negros) pueden pasar de un astrocito a un oligodendrocito (A) pero no pueden volver en la otra dirección (B)."

Aunque este artículo pasó la evaluación en una revista científica respetada, se dirigieron diversas cartas al editor (1994), demostrando que el modelo de Robinson y colaboradores violaba la segunda ley de la termodinámica.

(a) Explique de qué modo el modelo viola la segunda ley. Pista: Considere qué le pasaría a la entropía del sistema si uno empezase con concentraciones iguales de colorante en el astrocito y oligodendrocito conectados por la unión en hendidura tipo "nasa".

(b) Explique por qué este modelo no puede funcionar con moléculas pequeñas, aunque permita pescar peces.

(c) Explique por qué una nasa *funciona* con los peces.

(d) Proporcione dos mecanismos plausibles para el transporte unidireccional de las moléculas de colorante entre las células que no viole la segunda ley de la termodinámica.

COPY-STATION

Referencias

Cartas al editor 1994. *Science* 265:1017–1019.
Robinson, S.R., E.C.G.M. Hampson, M.N. Munro, and D.I. Vaney. 1993. Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* 262:1072–1074.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 14

Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

14.1 Glucólisis 534

14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis 549

14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación 552

14.4 Gluconeogénesis 557

14.5 Ruta de las pentosas fosfato de oxidación de la glucosa 564

COPY-STATION

La glucosa ocupa una posición central en el metabolismo de plantas, animales y muchos microorganismos. Es relativamente rica en energía potencial por lo que es un buen combustible; su oxidación completa a dióxido de carbono y agua transcurre con una variación de energía libre estándar de –2.840 kJ/mol. Almacenando la glucosa en forma de polímero de elevada masa molecular tal como el almidón o el glucógeno, una célula puede acumular grandes cantidades de unidades de hexosa, al tiempo que mantiene una osmolaridad citosólica relativamente baja. Cuando las necesidades energéticas aumentan, la glucosa puede liberarse a partir de estos polímeros de almacenamiento intracelular y utilizarse para producir ATP, ya sea aeróbica o anaeróbicamente.

La glucosa no es sólo un combustible excelente sino también un precursor extremadamente versátil, capaz de suministrar una gran cantidad de intermediarios metabólicos para las reacciones biosintéticas. Una bacteria tal como *Escherichia coli* puede obtener de la glucosa los esqueletos carbonados de cada uno de los aminoácidos, nucleótidos, coenzimas, ácidos grasos y otros intermediarios metabólicos necesarios para el crecimiento. El estudio completo de los destinos metabólicos de la glucosa abarcaría cientos o miles de transformaciones. En los animales y plantas superiores la glucosa tiene cuatro destinos principales: se puede utilizar (1) para la síntesis de polisacáridos complejos destinados al espacio extracelular; (2) puede ser almacenada (en forma de polisacáridos o de sacarosa); (3) oxidada a un compuesto de tres carbonos (piruvato) vía glucólisis para proporcionar ATP e intermediarios metabólicos, o (4) oxidada por la ruta de las pentosas fosfato (fosfogluconato) para obtener ribosa 5-fosfato utilizada en la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH para los los procesos biosintéticos reductores **(Fig. 14-1)**.

Los organismos que no tienen acceso a la glucosa de otras fuentes deben fabricarla. Los organismos fotosintéticos forman glucosa reduciendo el CO_2 atmosférico a triosas para, seguidamente, convertir éstas en glucosa. Las células no fotosintéticas fabrican glucosa a partir de precursores más sencillos de tres o cuatro átomos de carbono mediante el proceso de la gluconeogénesis, invirtiendo de manera efectiva la glucólisis en una ruta que utiliza una gran parte de los enzimas glucolíticos.

En este capítulo se describen las reacciones individuales de la glucólisis, gluconeogénesis y la ruta de las pentosas fosfato así como el significado funcional de cada ruta. También se describen los distintos destinos metabólicos del piruvato producido en la glucólisis; se incluyen las fermentaciones utilizadas por muchos microorganismos en nichos anaeróbicos para producir ATP y que son explotados industrialmente como fuentes de etanol, ácido láctico y otros productos útiles para



FIGURA 14-1 Principales rutas de utilización de la glucosa. Aunque no son los únicos destinos posibles de la glucosa, estas cuatro rutas son las más significativas en función de la cantidad de glucosa que fluye a través de las mismas en la mayoría de las células.

la industria. También se consideran las rutas que conducen diversos azúcares, obtenidos de mono-, di- y polisacáridos, hacia la ruta glucolítica. La discusión del metabolismo de la glucosa continúa en el Capítulo 15 en el que utilizamos los procesos de síntesis de glúcidos para ilustrar los muchos mecanismos mediante los que los organismos regulan las rutas metabólicas. Las rutas biosintéticas que van de la glucosa a los polisacáridos de la matriz extracelular y de la pared celular y a los polisacáridos de reserva se discuten en el Capítulo 20.



Hans Von Euler-Chelpin, 1873-1964 [Fuente: Austrian Archives/Corbis.]



Gustav Embden, 1874-1933



Otto Meyerhof, 1884-1951 [Fuente: Science Source.]

14.1 Glucólisis

En la **glucólisis** (del griego *glykys*, "dulce" y *lysis*, "romper") se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, dando dos moléculas del compuesto de tres carbonos piruvato. Durante la secuencia de reacciones de la glucólisis, parte de la energía libre cedida por la glucosa se conserva en forma de ATP y NADH. La glucólisis fue la primera ruta metabólica elucidada y es, probablemente, la que se conoce mejor. Desde el descubrimiento por Eduard Buchner en 1897 de la fermentación en extractos acelulares de levadura, hasta la formulación de la ruta completa en la levadura (por Otto Warburg y Hans von Euler-Chelpin) y en el músculo (por Gustav Embden y Otto Meyerhof) en la década de 1930, las reacciones de la glucólisis en extractos de levadura y en músculo constituyeron un foco principal de la investigación bioquímica. El cambio filosófico que acompañó estos descubrimientos fue anunciado por Jacques Loeb en 1906:

> Gracias al descubrimiento de Buchner, la Biología se liberó de otro fragmento de misticismo. La rotura del azúcar en CO_2 y alcohol ya no es el efecto de un "principio vital" al igual que no lo es la rotura del azúcar de caña por la invertasa. La historia de este problema es instructiva ya que nos previene de considerar problemas como fuera de nuestro alcance porque aún no hemos encontrado su solución*.

El desarrollo de métodos para la purificación de enzimas, el descubrimiento y reconocimiento de la importancia de coenzimas tales como el NAD, y el descubrimiento del papel fundamental del ATP y otros compuestos fosforilados, fueron todos consecuencia de estudios sobre la glucólisis. Los enzimas glucolíticos de muchos organismos ya se han purificado y estudiado a fondo desde hace tiempo.

La glucólisis es una ruta central, casi universal, del catabolismo de la glucosa, la ruta con el mayor flujo de carbono en la mayoría de las células. En ciertos tejidos de mamífero y algunos tipos de células (eritrocitos, médula renal, cerebro y esperma, por ejemplo), la degradación glucolítica de la glucosa es la única fuente de energía metabólica. Algunos tejidos vegetales modificados con el fin de almacenar almidón (tales como los tubérculos de patata) y algunas plantas acuáticas (los berros, por ejemplo) obtienen la mayor parte de su energía a partir de la glucólisis; muchos microorganismos anaeróbicos dependen totalmente de esta ruta metabólica.

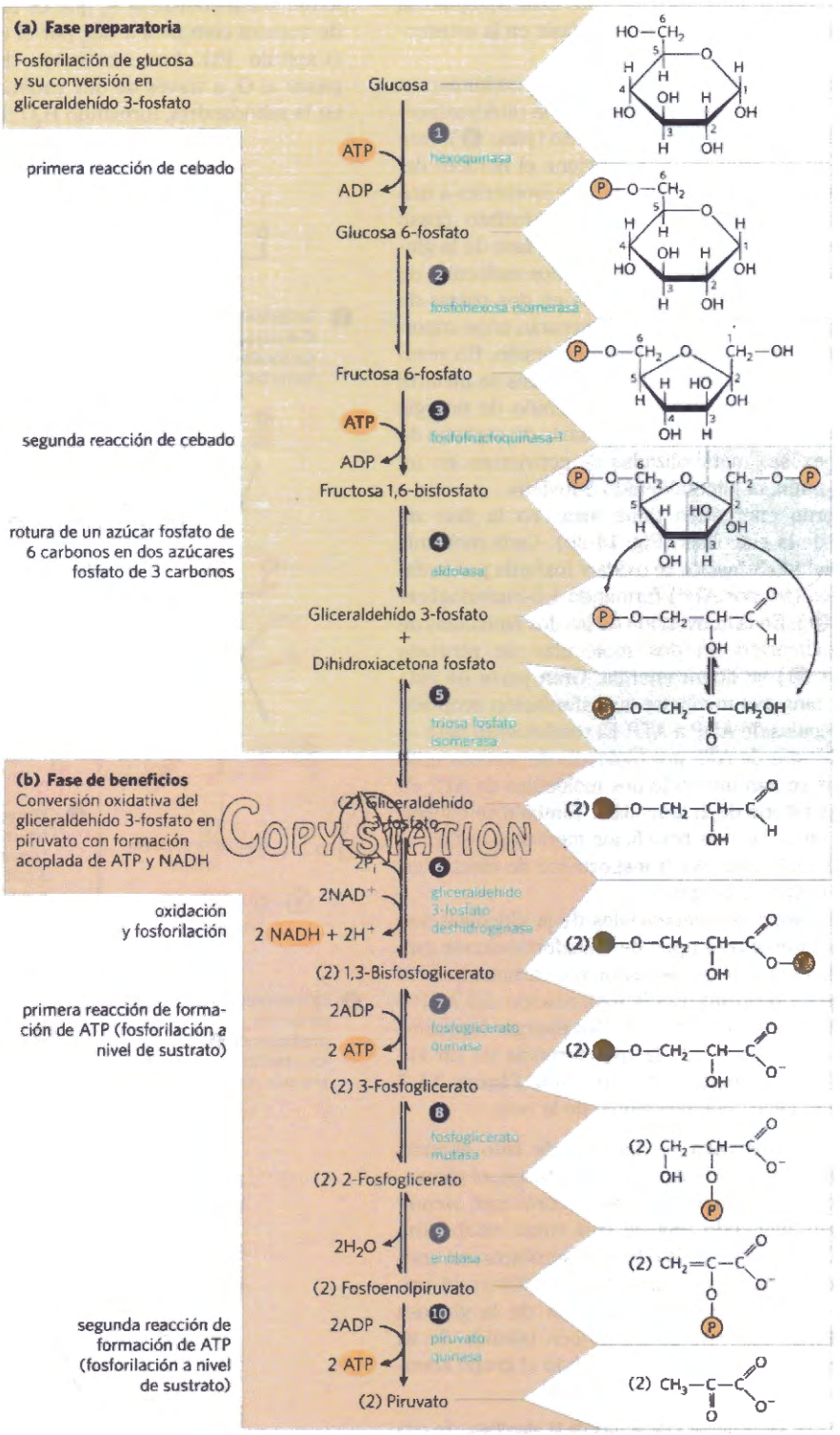
Fermentación es un término general que indica degradación *anaeróbica* de la glucosa u otros nutrientes orgánicos, para obtener energía en forma de ATP. Debido a que los seres vivos aparecieron en primer lugar en una atmósfera carente de oxígeno, la degradación anaeróbica de la glucosa es probablemente el mecanismo biológico más antiguo para obtener energía a partir de moléculas combustibles orgánicas. La secuenciación del genoma de una gran variedad de organismos ha revelado que algunas arquebacterias y algunos microorganismos parásitos carecen de uno o varios enzimas de la glucólisis si bien mantienen el núcleo de la ruta; probablemente utilizan formas variantes de la glucólisis. En el transcurso de la evolución la química de esta secuencia de reacciones se ha conservado completamente; los enzimas glucolíticos de los animales vertebrados son muy similares en secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional, a sus homólogos de la levadura o la espinaca. El proceso de la glucólisis sólo difiere de una especie a otra en los detalles de su regulación y en el destino posterior del piruvato formado. Los principios termodinámicos y los tipos de mecanismos reguladores en la glucólisis se encuentran en todas las rutas del metabolismo celular. La ruta glucolítica, de importancia crucial por sí misma, puede servir, por tanto, como modelo de muchos aspectos de las rutas que se discuten más adelante en este libro.

Antes de examinar detalladamente cada paso de la ruta, observaremos la glucólisis en su conjunto.

Una visión global: la glucólisis tiene dos fases

La rotura de la glucosa, que tiene seis carbonos, en dos moléculas de piruvato, formado por tres carbonos, tiene lugar en 10 pasos, de los que los 5 primeros constituyen la *fase preparatoria* **(Figura 14-2a)**. En estas reacciones la glucosa es fosforilada en primer lugar en el grupo hidroxilo en C-6 (paso ❶). La D-glucosa 6-fosfato así formada se convierte en D-fructosa 6-fosfato (paso ❷), la cual vuelve a ser fosforilada, esta vez en C-1, dando D-fructosa 1,6-bisfosfato (paso ❸). El ATP es el dador del grupo fosforilo en ambas fosforilaciones. Dado que todos los derivados de azúcares en la glucólisis son

*De J. Loeb, *The Dynamics of Living Matter*, Columbia University Prerss, New York, 1906.]



COPY-STATION

FIGURA 14-2 Las dos fases de la glucólisis. Por cada molécula de glucosa que pasa a través de la fase preparatoria **(a)** se forman dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato; ambas pasan a la fase de beneficios **(b)**. El piruvato es el producto final de la segunda fase de la glucólisis. Por cada molécula de glucosa se consumen dos de ATP en la fase preparatoria y se producen cuatro de ATP en la fase de beneficios, dando un rendimiento neto de dos ATP por molécula de glucosa convertida en piruvato. El número al lado de cada paso de reacción se corresponde con su número en la discusión del texto. Hay que tener presente que cada grupo fosforilo, representado aquí como Ⓟ, tiene dos cargas negativas ($-PO_3^{2-}$).

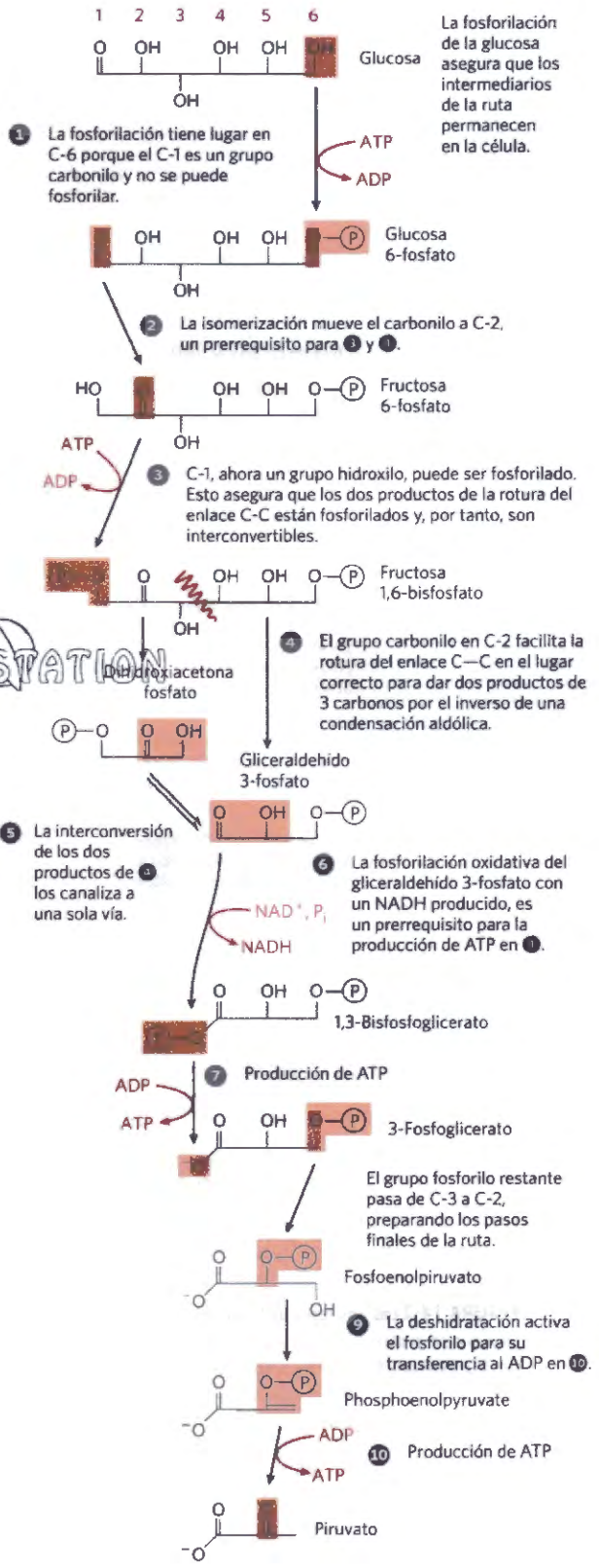
isómeros D, omitiremos normalmente esta designación excepto cuando se trate de poner énfasis en la estereoquímica.

La fructosa 1,6-bisfosfato se parte a continuación dando dos moléculas de tres carbonos, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato (paso ❹); éste es el paso de la "lisis" del que proviene el nombre del proceso. La dihidroxiacetona fosfato se isomeriza a una segunda molécula de gliceraldehído 3-fosfato (paso ❺), lo que pone punto final a la primera fase de la glucólisis. Observe que se han de invertir dos moléculas de ATP antes de la rotura de la glucosa en dos piezas de tres carbonos; posteriormente se generarán unos importantes dividendos a cambio de esta inversión. En resumen: en la fase preparatoria de la glucólisis se invierte la energía del ATP, elevando el contenido de energía libre de los intermediarios, y las cadenas de carbono de todas las hexosas metabolizadas se convierten en un producto común, el gliceraldehído 3-fosfato.

El retorno energético tiene lugar en la *fase de beneficios* de la glucólisis (Fig. 14-2b). Cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato se oxida y fosforila por fosfato inorgánico (*no* por ATP) formando 1,3-bisfosfoglicerato (paso ❻). En la conversión de las dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato en dos moléculas de piruvato (pasos ❼ a ❿) se libera energía. Gran parte de esta energía se conserva mediante la fosforilación acoplada de dos moléculas de ADP a ATP. El rendimiento neto es de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa utilizada, ya que se han invertido dos moléculas de ATP en la fase preparatoria de la glucólisis. También se conserva energía en la fase de beneficios mediante la formación de dos moléculas del transportador de electrones NADH por molécula de glucosa.

En las reacciones secuenciales de la glucólisis son de especial interés tres tipos de transformaciones químicas: (1) la degradación del esqueleto carbonado de la glucosa que da piruvato, (2) la fosforilación del ADP a ATP por compuestos fosfato de alta energía formados durante la glucólisis y (3) la transferencia de un ión hidruro al NAD+, formando NADH. En la **Figura 14-3** se describe la lógica química global de la ruta.

Destinos del piruvato Si dejamos de lado algunas variantes interesantes dentro de las bacterias, el piruvato formado en la glucólisis puede continuar siendo metabolizado siguiendo una de tres rutas catabólicas distintas. En los organismos o tejidos aeróbicos, en condiciones aeróbicas, la glucólisis sólo constituye el primer paso en la degradación completa de la glucosa **(Fig. 14-4)**. El piruvato se oxida, con pérdida de su grupo carboxilo en forma de CO_2, dando el grupo acetilo del acetil-coenzima A, que es oxidado seguidamente de manera completa a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). Los electrones de estas oxidaciones pasan al O_2 a través de una cadena de transportadores en la mitocondria, formando H_2O. La energía proceden-



COPY-STATION

FIGURA 14-3 La lógica química de la ruta de la glucólisis. En esta versión simplificada de la ruta, se muestra cada molécula en forma lineal, sin dibujar los átomos de carbono e hidrógeno, con el fin de resaltar las transformaciones químicas. Recuerde que la glucosa y la fructosa están presentes mayoritariamente en sus formas cicladas en solución, aunque están presentes transitoriamente en forma lineal en los sitios activos de algunos de los enzimas de esta ruta.

La fase preparatoria, pasos ❶ a ❺, convierten la glucosa de seis carbonos en dos unidades de tres carbonos, cada una de ellas en forma fosforilada. La oxidación de las unidades de tres carbonos se inicia en la fase de beneficios. Para producir piruvato, los pasos químicos se han de dar en el orden mostrado.

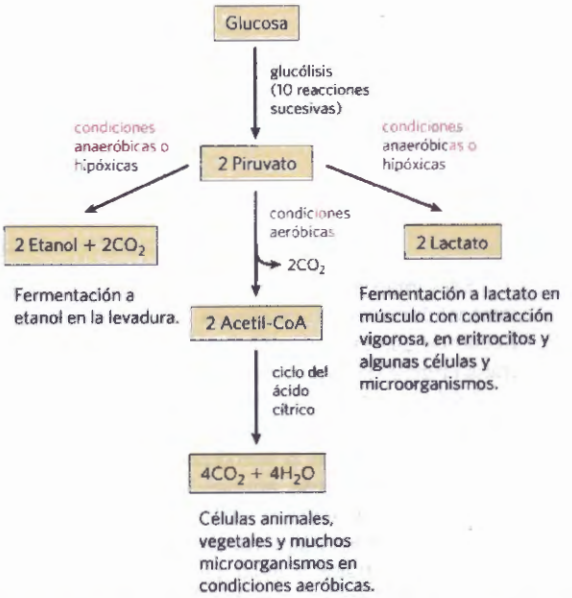


FIGURA 14-4 Tres posibles destinos catabólicos del piruvato producido en la glucólisis. El piruvato también sirve como precursor en muchas reacciones anabólicas, no mostradas aquí

te de las reacciones de transferencia electrónica impulsa la síntesis de ATP en la mitocondria (Capítulo 19).

La segunda ruta para el piruvato es su reducción a lactato vía **fermentación del ácido láctico**. Durante la contracción vigorosa el músculo esquelético ha de funcionar con bajas concentraciones de oxígeno (**hipoxia**), así el NADH no puede ser reoxidado a NAD+, si bien este último es el aceptor de electrones imprescindible para la posterior oxidación del piruvato. En estas condiciones, el piruvato se reduce a lactato al aceptar los electrones del NADH, con lo que se regenera así el NAD+ necesario para que continúe la glucólisis. Algunos tipos celulares y tejidos (retina y eritrocitos, por ejemplo) convierten la glucosa en lactato incluso en condiciones aeróbicas. En algunos microorganismos el producto de la glucólisis en condiciones anaeróbicas es también el lactato (Fig. 14-4).

La tercera ruta principal del catabolismo del piruvato conduce al etanol. En algunos tejidos vegetales y en ciertos invertebrados, protistas, y microorganismos tales como la levadura de la cerveza o de panificación, el piruvato se convierte, en condiciones anaeróbicas o de hipoxia, en etanol y CO_2, proceso denominado **fermentación etanólica** (o **alcohólica**) (Fig. 14-4).

La oxidación del piruvato es un proceso catabólico importante, pero el piruvato tiene también destinos anabólicos. Puede, por ejemplo, proporcionar el esqueleto carbonado para la síntesis del aminoácido alanina o para la síntesis de ácidos grasos. En capítulos posteriores estudiaremos estas reacciones anabólicas del piruvato.

Formación de ATP y NADH acoplada a la glucólisis Durante la glucólisis parte de la energía de la molécula de glucosa se conserva en forma de ATP, mientras que la mayor parte de la misma permanece en el producto, piruvato. La ecuación global de la glucólisis es:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (14\text{-}1)$$

Por cada molécula de glucosa degradada a piruvato, se generan dos moléculas de ATP a partir de ADP y Pi y se producen dos moléculas de NADH por reducción del NAD^+. El aceptor de hidrógeno en esta reacción es el NAD^+ (véase la Fig. 13-24), unido a un pliegue Rossmann tal como se muestra en la Figura 13-25. La reducción del NAD^+ se realiza mediante transferencia enzimática de un ión hidruro ($:H^-$) desde el grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato al anillo de nicotinamida del NAD^+, dando el coenzima reducido NADH. El otro átomo de hidrógeno se libera a la solución en forma de H^+.

Podemos ahora dividir la ecuación de la glucólisis en dos procesos: la conversión de la glucosa en piruvato, que es exergónica:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \quad (14\text{-}2)$$
$$\Delta G_1'^\circ = -146\ \text{kJ/mol}$$

Y la formación de ATP a partir de ADP y Pi, que es endergónica:

$$2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (14\text{-}3)$$
$$\Delta G_2'^\circ = 2(30.5\ \text{kJ/mol}) = 61.0\ \text{kJ/mol}$$

La suma de las ecuaciones 14-2 y 14-3 es la variación global de energía libre estándar de la glucólisis, $\Delta G'^\circ_{\text{Suma}}$:

$$\Delta G'^\circ_{\text{Sum}} = \Delta G_1'^\circ + \Delta G_2'^\circ = -146\ \text{kJ/mol} + 61.0\ \text{kJ/mol} = -85\ \text{kJ/mol}$$

Tanto en condiciones estándar como intracelulares (no estándar), la glucólisis es un proceso esencialmente irreversible, conducido hasta su totalidad por un gran descenso neto de energía libre.

Energía remanente en el piruvato La glucólisis sólo libera una pequeña fracción de la energía total disponible de la molécula de glucosa; las dos moléculas de piruvato formadas por la glucólisis aún contienen la mayor parte de la energía química potencial obtenible de la molécula de glucosa, energía que se puede extraer mediante reacciones oxidativas en el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16) y en la fosforilación oxidativa (Capítulo 19).

Importancia de los intermediarios fosforilados Cada uno de los nueve intermediarios glucolíticos entre la glucosa y el piruvato está fosforilado (Fig. 14-2). El grupo fosforilo parece tener tres funciones.

1. Como sea que la membrana plasmática carece de transportadores para los azúcares fosforilados, los intermediarios glucolíticos fosforilados no pueden abandonar la célula. Después de la fosforilación inicial, la célula ya no ha de gastar más energía para retener los intermediarios fosforilados, a pesar de la gran diferencia de las concentraciones intra y extracelulares.
2. Los grupos fosforilo son componentes esenciales en la conservación enzimática de la energía metabólica. La energía liberada en la rotura de enlaces fosfoanhídridos (tales como los del ATP) se conserva parcialmente en la formación de ésteres fosfato

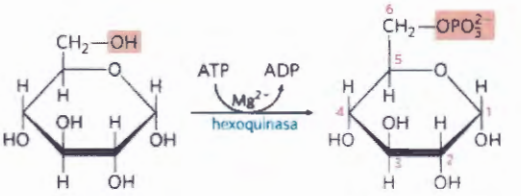
tales como la glucosa 6-fosfato. Los compuestos fosfato de alta energía que se forman en la glucólisis (1,3-bisfosfoglicerato y fosfoenolpiruvato) donan grupos fosforilo al ADP para formar ATP.

3. La fijación de los grupos fosfato a los sitios activos de los enzimas disminuyen la energía de activación y aumenta la especificidad de las reacciones enzimáticas (Capítulo 6). Los grupos fosfato del ADP, ATP y de los intermediarios glucolíticos forman complejos con el Mg^{2+}, siendo los sitios de unión de sustrato de muchos enzimas glucolíticos específicos para esos complejos de Mg^{2+}. Casi todos los enzimas glucolíticos requieren Mg^{2+} para su actividad.

La fase preparatoria de la glucólisis precisa ATP

En la fase preparatoria de la glucólisis se invierten dos moléculas de ATP y se rompe la cadena de hexosa en dos triosas fosfato. El conocimiento de que las hexosas *fosforiladas* eran intermediarios de la glucólisis fue lento y casual. En 1906, Arthur Harden y William Young comprobaron su hipótesis de que los inhibidores de los enzimas proteolíticos estabilizarían los enzimas fermentadores de la glucosa en el extracto de levadura. Añadieron suero sanguíneo (que ya se sabía que contenían inhibidores de enzimas proteolíticos) a extractos de levaduras y observaron la estimulación previsible del metabolismo de la glucosa. No obstante, en un experimento control diseñado para demostrar que la ebullición del suero destruía la actividad estimuladora, descubrieron que el suero hervido era igualmente efectivo como estimulante de la glucólisis. El examen cuidadoso del contenido del suero hervido demostró que el responsable de la estimulación era el fosfato inorgánico. Harden y Young pronto descubrieron que la glucosa añadida a su extracto de levadura era convertida en hexosa bisfosfato (el "éster de Harden-Young", posteriormente identificado como fructosa 1,6-bisfosfato). Este fue el principio de una larga serie de investigaciones sobre el papel de los ésteres orgánicos y anhídridos del fosfato en bioquímica que nos ha llevado a nuestro actual conocimiento sobre el papel central de la transferencia del grupo fosforilo en biología.

❶ Fosforilación de la glucosa En el primer paso de la glucólisis, la glucosa se activa para reacciones posteriores mediante la fosforilación en el C-6 dando **glucosa 6-fosfato**; el ATP es el dador de fosforilo:



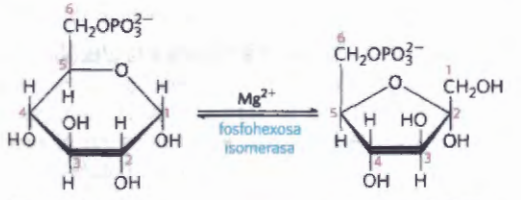
$\Delta G'^{\circ} = -16.7$ kJ/mol

Esta reacción, que es irreversible en condiciones intracelulares, está catalizada por la **hexoquinasa**. Recuerde que las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP a algún nucleófilo aceptor (véase la Fig. 13-20). Las quinasas son una subclase de transferasas (véase la Tabla 6-3). El aceptor en el caso de la hexoquinasa es una hexosa, normalmente la D-glucosa, aunque la hexoquinasa también cataliza la fosforilación de otras hexosas comunes, tales como la D-fructosa y la D-manosa, en algunos tejidos.

La hexoquinasa, al igual que otras muchas quinasas, necesita Mg^{2+} para su actividad, porque el verdadero sustrato del enzima no es el ATP^{4-} sino el complejo $MgATP^{2-}$ (véase la Fig. 13-12). El Mg^{2+} apantalla las cargas negativas de los grupos fosforilo del ATP haciendo que el átomo de fósforo terminal sea una diana más fácil para el ataque nucleofílico por un –OH de la glucosa. La hexoquinasa experimenta un cambio profundo en su forma, un acoplamiento inducido, cuando fija la glucosa; dos dominios de la proteína se desplazan acercándose unos 8 Å cuando se une el ATP (véase la Fig. 6-26). Este movimiento acerca el ATP a una molécula de glucosa también unida al enzima y bloquea el acceso de agua (del disolvente), el cual podría de otro modo entrar en el sitio activo y atacar (hidrolizar) los enlaces fosfoanhídrido del ATP. Al igual que los otros nueve enzimas de la glucólisis la hexoquinasa es una proteína citosólica soluble.

La hexoquinasa se encuentra en casi todos los organismos. El genoma humano codifica cuatro hexoquinasas diferentes (I a IV) que catalizan todas ellas la misma reacción. Dos o más enzimas que catalizan la misma reacción pero que están codificados por genes distintos se denominan **isozimas** (Véase el Recuadro 15-2). Uno de los isozimas pesente en los hepatocitos, la hexoquinasa IV (también llamada glucoquinasa) se diferencia de otras formas de hexoquinasas por sus propiedades cinéticas y de regulación con consecuencias fisiológicas importantes que se describen en la Sección 15.3.

❷ Conversión de la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato El enzima **fosfohexosa isomerasa** (**fosfoglucosa isomerasa**) cataliza la isomerización reversible de la glucosa 6-fosfato, una aldosa, en **fructosa 6-fosfato**, una cetosa:



$\Delta G'^{\circ} = 1.7$ kJ/mol



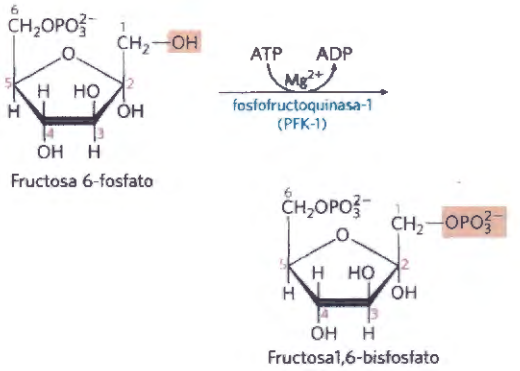
Arthur Harden, 1865-1940 [Fuente: Mary Evans Picture Library/Alamy.]



William Young, 1878-1942 [Fuente: cortesía del Medical History Museum, The University of Melbourne.]

El mecanismo de esta reacción se realiza a través de un intermedio enediol **(Figura 14-5)**. La reacción transcurre fácilmente en cualquiera de las dos direcciones, tal como lo predice la variación relativamente pequeña de la energía libre estándar.

❸ Fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato En la segunda de las dos reacciones activadoras de la glucólisis, la **fosfofructoquinasa-1 (PFK-1)** cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP a la fructosa 6-fosfato para dar **fructosa 1,6-bisfosfato**:



$\Delta G'^{\circ} = -14.2$ kJ/mol

» **Convención clave:** Los compuestos que contienen dos fosfatos o grupos fosforilo unidos en posiciones diferentes de la molécula se denominan *bisfosfatos* (o compuestos *bisfosfo*); por ejemplo, la fructosa 1,6-bisfosfato y el 1,3-bisfosfoglicerato. Los compuestos con dos fosfatos unidos en forma de grupo pirofosforilo se denominas *difosfatos*; por ejemplo,adenosina difosfato (ADP). Reglas similares son de aplicación para nombrar *trisfosfatos* (tales como el insoitol 1,4,5-trisfosfato; véase la p. 451) y *trifosfatos* (tales como adenosina trifosfato, ATP). «

El enzima que forma fructosa 1,6-bisfosfato se denomina PFK-1 para distinguirlo de un segundo enzima (PFK-2) que cataliza la formación de fructosa 2,6-bisfosfato a partir de la fructosa 6-fosfato en una ruta diferente (la función de la PFK-2 y de la fructosa 2,6-bisfosfato se discuten en el Capítulo 15). La reacción de la PFK-1 es prácticamente irreversible en las condiciones celulares y constituye el primer paso "comprometido" en la ruta glucolítica; la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato tienen otros destinos posibles, pero la fructosa 1,6-bisfosfato está destinada a la glucólisis.

Algunas bacterias y protistas y quizás todas las plantas, tienen una fosfofructoquinasa (PP-PFK-1) que utiliza pirofosfato (PPi), no ATP, como dador del grupo fosforilo en la síntesis de fructosa 1,6-bisfosfato:

Fructosa 6-fosfato + PP_i $\xrightarrow{Mg^{2+}}$ fructosa 1,6-bisfosfato + P_i

$\Delta G'^{\circ} = -2.9$ kJ/mol

La fosfofructoquinasa-1 está sujeta a una compleja regulación alostérica; su actividad aumenta siempre que se agota el suministro de ATP en las células o cuando existe un exceso de los productos de rotura del ATP, es decir el ADP y el AMP (especialmente el segundo). El enzima es inhibido siempre que la célula tenga mucho ATP y disponga de un buen suministro de otros combustibles, tales como ácidos grasos. En algunos organismos, la fructosa 2,6-bisfosfato (no confundir con el producto de reacción de la PFK-1, fructosa-1,6-bisfosfato) es un potente activador alostérico de la PFK-1. La ribulosa

Cengage Learning

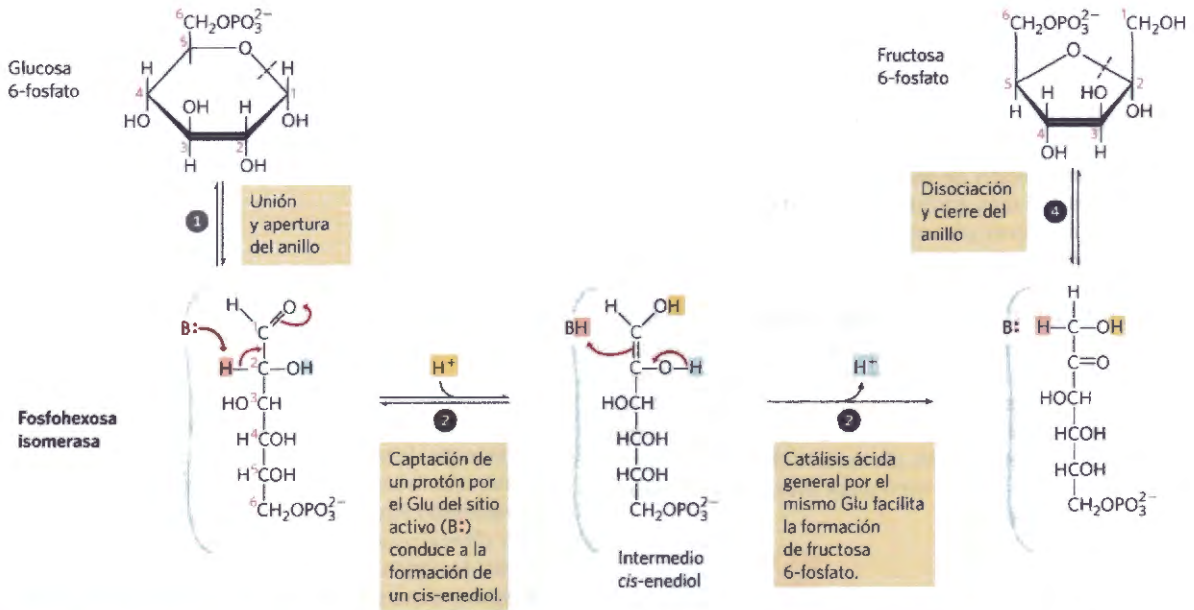
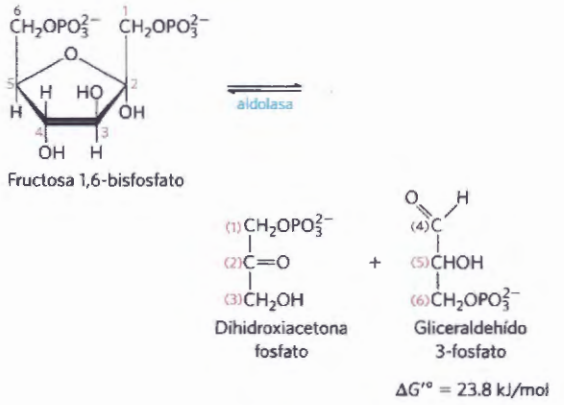


FIGURA MECANISMO 14-5 Reacción de la fosfohexosa isomerasa. Las reacciones de abertura y cierre del anillo (pasos ❶ y ❹) están catalizadas por un residuo His del sitio activo, mediante un mecanismo aquí omitido por motivos de claridad. El protón (rosa) inicialmente en C-2 se hace más fácilmente extraíble por eliminación electrónica del carbonilo adyacente y grupos hidroxilo cercanos. Después de su transferencia desde el C-2 al residuo Glu del sitio activo (un ácido débil), el protón se intercambia libremente con la solución que lo rodea; esto es, el protón extraído de C-2 en el paso ❷ no es necesariamente el mismo que se añade a C-1 en el paso ❸.

5-fosfato, intermediario de la ruta de las pentosas fosfato discutida más adelante en este capítulo, también activa de modo indirecto la fosfofructoquinasa. Los múltiples niveles de regulación de este paso de la glucólisis se discutirán con más detalle en el Capítulo 15.

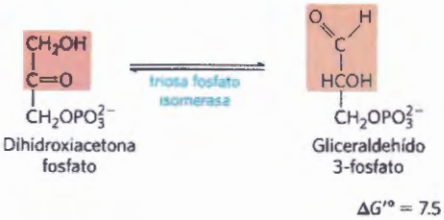
❹ Rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato El enzima **fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa**, a menudo llamado simplemente **aldolasa**, cataliza una condensación aldólica reversible (véase la Fig. 13-4). La fructosa 1,6-bisfosfato se rompe dando dos triosas fosfato diferentes, el **gliceraldehído 3-fosfato**, una aldosa, y la **dihidroxiacetona fosfato**, una cetosa:



Existen dos clases de aldolasas. Las aldolasas de la clase I, presentes en animales y plantas, utilizan el mecanismo mostrado en la **Figura 14-6**. Los enzimas de la clase II, de hongos y bacterias, no forman la base de Schiff intermedia. En lugar de ello, contienen un ión zinc en el sitio activo coordinado con el oxígeno carbonílico en C-2; el Zn^{2+} polariza el grupo carbonilo y estabiliza el intermedio enolato creado en el paso de rotura del enlace C–C (véase la Fig 6-19).

Aunque la reacción de la aldolasa tiene una variación de energía libre estándar fuertemente positiva en la dirección de la rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato, a las bajas concentraciones de reactivos presentes en las células, la variación de energía libre real es pequeña por lo que la reacción de la aldolasa es fácilmente reversible. Veremos más adelante que la aldolasa actúa en la dirección inversa durante el proceso de la gluconeogénesis (véase la Fig. 14-17).

❺ Interconversión de las triosas fosfato Solamente una de las dos triosas fosfato formadas por la aldolasa, el gliceraldehído 3-fosfato, puede ser degradada directamente en los siguientes pasos de la glucólisis. El otro producto, la dihidroxiacetona fosfato, se convierte rápida y reversiblemente en gliceraldehído 3-fosfato por el quinto enzima de la secuencia glucolítica, la **triosa fosfato isomerasa**:



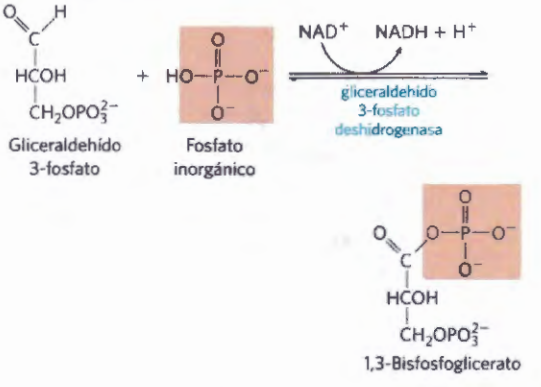
El mecanismo de reacción es similar a la reacción promovida por la fosfohexosa isomerasa en el paso ❷ de la glucólisis (Fig. 14-55). Después de la reacción de la triosa fosfato isomerasa los carbonos C-1, C-2 y C-3 de la glucosa inicial son químicamente indistinguibles de los carbonos C-6, C-5 y C-4, respectivamente **(Fig. 14-7)**; ambas "mitades" de la glucosa producen gliceraldehído 3-fosfato.

Esta reacción completa la fase preparatoria de la glucólisis. La molécula de hexosa se ha fosforilado en C-1 y C-6 y a continuación se ha partido para formar dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato.

La fase de beneficios de la glucólisis produce ATP y NADH

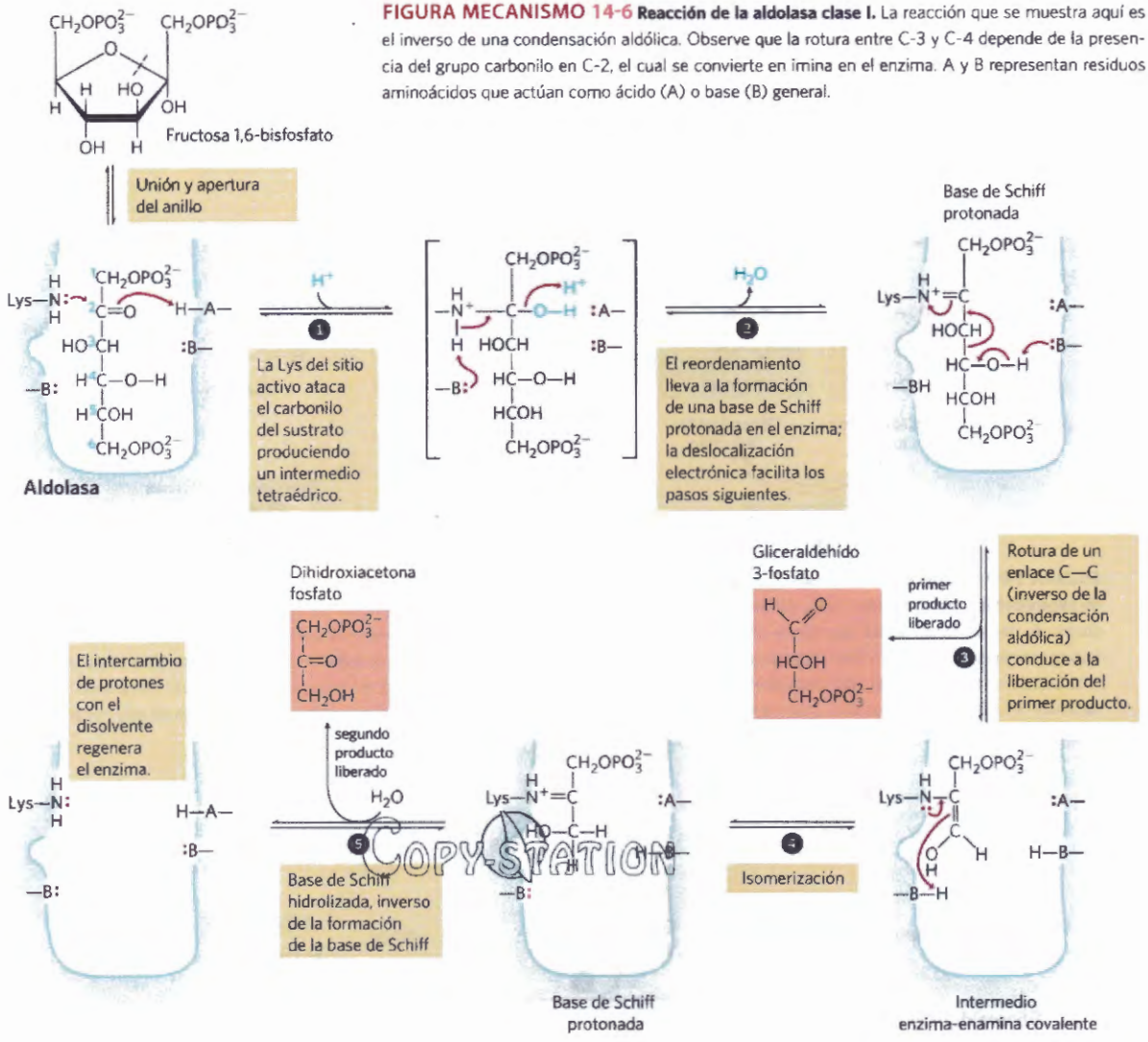
La fase de beneficios de la glucólisis (Fig. 14-2b) incluye los pasos de fosforilación conservadores de energía en los que parte de la energía libre de la molécula de glucosa se conserva en forma de ATP y NADH. Recuerde que una molécula de glucosa produce dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato y que las dos mitades de la molécula de glucosa siguen la misma ruta en la segunda fase de la glucólisis. La conversión de dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato en dos de piruvato se acompaña de la formación de cuatro moléculas de ATP a partir de ADP. Sin embargo, el rendimiento neto de ATP por molécula de glucosa degradada es sólo de dos, porque se han invertido dos moléculas de ATP en la fase preparatoria de la glucólisis para fosforilar los dos extremos de la molécula de hexosa.

❻ Oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato El primer paso de esta fase de beneficios es la conversión del gliceraldehído 3-fosfato en **1,3-bisfosfoglicerato**, catalizada por la **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa:**



Esta es la primera de las dos reacciones conservadoras de energía de la glucólisis que conducen, en último término, a la formación de ATP. El grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato es oxidado, no a un grupo carboxílico libre sino a un anhídrido de ácido carboxílico con ácido fosfórico. Este tipo de anhídrido, llamado **acil fosfato**, tiene una energía libre de hidrólisis estándar muy elevada ($\Delta G'^{\circ}$= -49,3 kJ/mol; véanse la Fig. 13-14 y la Tabla 13-6). Gran parte de la energía libre de oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato se conserva mediante la formación del grupo acil fosfato en C-1 del 1,3-bisfosfoglicerato.

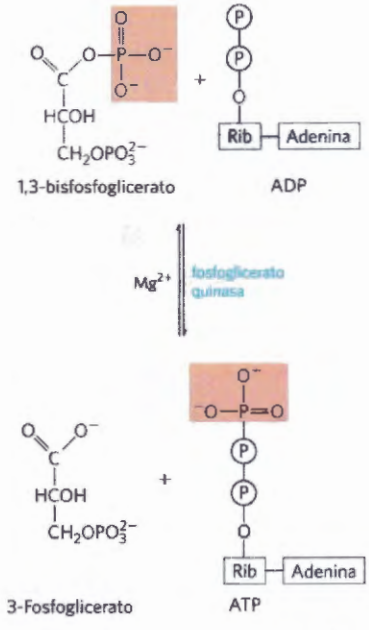
FIGURA MECANISMO 14-6 Reacción de la aldolasa clase I. La reacción que se muestra aquí es el inverso de una condensación aldólica. Observe que la rotura entre C-3 y C-4 depende de la presencia del grupo carbonilo en C-2, el cual se convierte en imina en el enzima. A y B representan residuos aminoácidos que actúan como ácido (A) o base (B) general.



El gliceraldehído 3-fosfato se une covalentemente a la deshidrogenasa durante la reacción **(Fig. 14-8)**. El grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato reacciona con el grupo -SH de un residuo Cys esencial del sitio activo, en una reacción análoga a la formación de un hemiacetal (véase la Fig. 7-5), pero en este caso el producto es un *tio*hemiacetal. La reacción del residuo Cys esencial con un metal pesado tal como el Hg^{2+} inhibe el enzima de modo irreversible.

La cantidad de NAD+ en una célula ($\leq 10^{-6}$ M) es muy inferior a la cantidad de glucosa metabolizada en unos pocos minutos. La glucólisis pronto se detendría si el NADH formado en este paso de la glucólisis no se reoxidara y reciclara continuamente. Volveremos a discutir este reciclado del NAD^+ más adelante en este capítulo.

❼ Transferencia de fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato al ADP El enzima **fosfoglicerato quinasa** transfiere el grupo fosforilo de alta energía desde el grupo carboxilo del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, formando ATP y **3-fosfoglicerato**:



$\Delta G'^{\circ} = -18.8$ kJ/mol

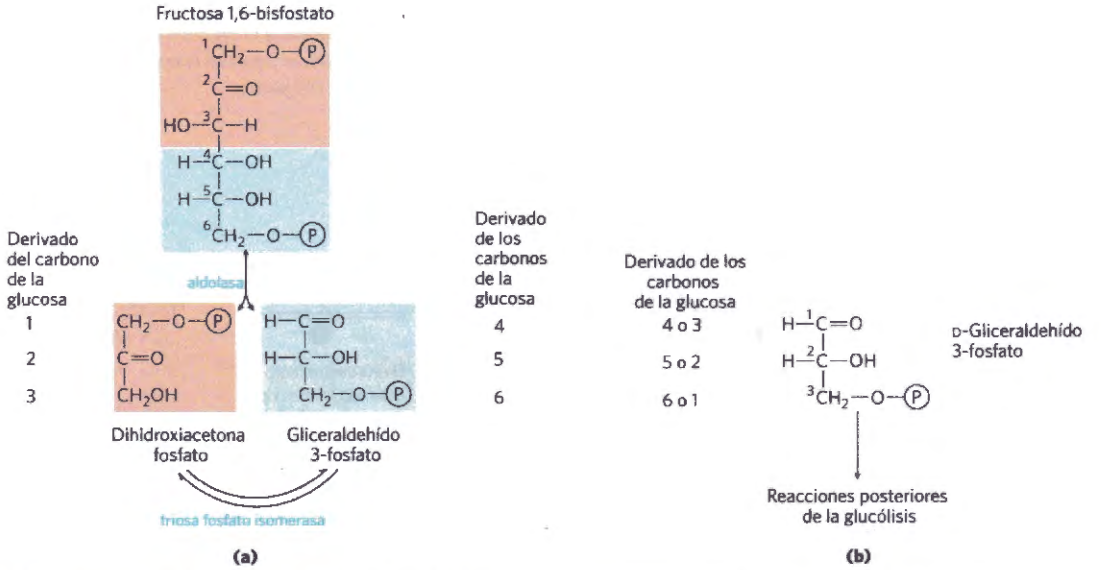


FIGURA 14-7 Destino de los carbonos de la glucosa en la formación de gliceraldehído 3-fosfato. (a) Origen de los carbonos en los dos productos de tres carbonos de las reacciones de la aldolasa y de la triosa fosfato isomerasa. El producto final de las dos reacciones es gliceraldehído 3-fosfato (dos moléculas). **(b)** Cada uno de los carbonos del gliceraldehído 3-fosfato proviene de uno u otro de dos carbonos específicos de la glucosa. Observe que la numeración de los átomos de carbono del gliceraldehído 3-fosfato no es idéntica a la numeración de los átomos de carbono de la glucosa de la que procede. En el gliceraldehído 3-fosfato, el grupo funcional más complejo (el carbonilo) se especifica como C-1. Este cambio en la numeración es importante para interpretar experimentos con glucosa en los que sólo se marca un carbono con un radioisótopo. (Véanse los problemas 6 y 9 al final de este capítulo).

COPY-STATION

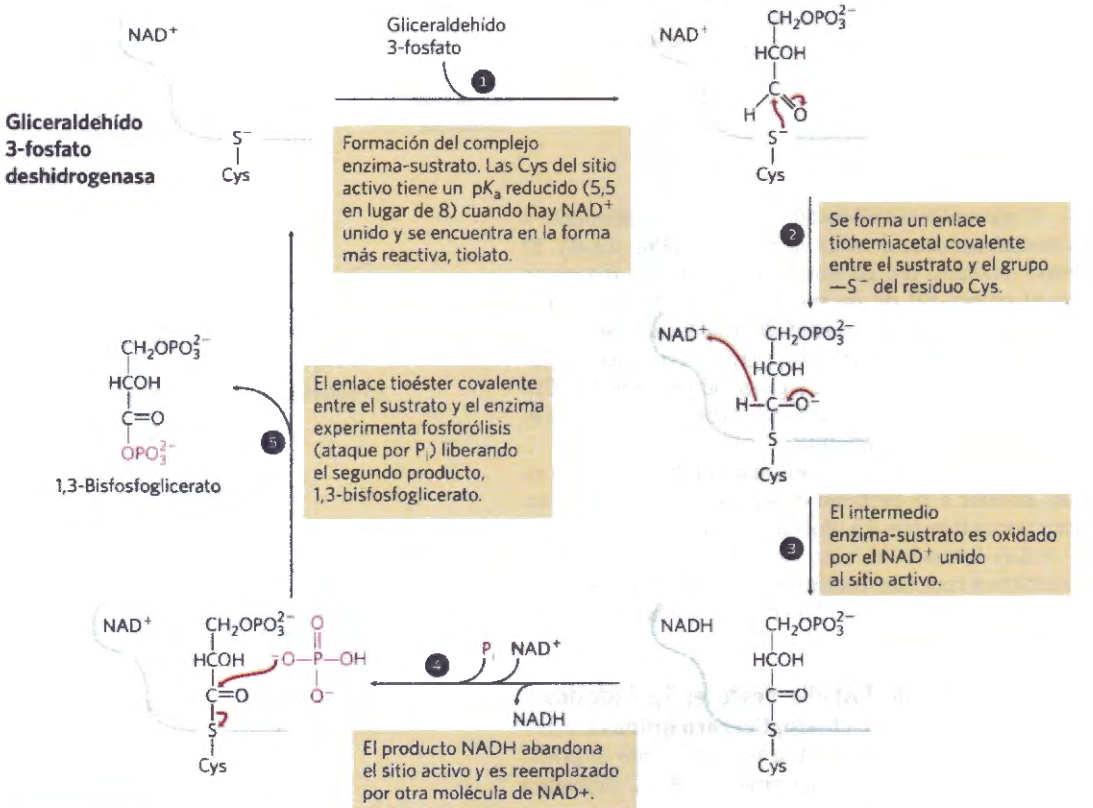


FIGURA MECANISMO 14-8 **Reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.**

Observe que el nombre de fosfoglicerato quinasa es por la reacción inversa en la que se transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al 3-fosfoglicerato. Como todos los enzimas, cataliza la reacción en ambas direcciones. Este enzima actúa en la dirección que indica su nombre durante la gluconeogénesis (véase la Fig. 14-17) y durante la asimilación fotosintética del CO_2 (véase la Fig 20-31). En la glucólisis la reacción catalizada se da tal como se ha mostrado anteriormnt, en la dirección de síntesis de ATP.

Los pasos ❻ y ❼ de la glucólisis constituyen, conjuntamente, un proceso de acoplamiento de energía en donde el 1,3-bisfosfoglicerato es el intermedio común; se forma en la primera reacción (que sería endérgonica como sistema aislado), y se transfiere su grupo acil fosfato al ADP en la segunda reacción (que es fuertemente exergónica). La suma de estas dos reacciones es:

$$\text{Gliceraldehído 3-fosfato} + \text{ADP} + P_i + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{H}^+ \qquad \Delta G'^\circ = -12.2 \text{ kJ/mol}$$

De esta manera la reacción global es exergónica.

Recuerde del Capítulo 13 que la variación de energía libre real, ΔG, viene determinada por la variación de energía libre estándar, $\Delta G'^\circ$, y el cociente de acción de masas, Q, que es el cociente [productos]/[reactivos] (véase ecn. 13-4). Para el paso ❻

$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln Q = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[\text{1,3 bisfosfoglicerato}][\text{NADH}][\text{H}^+]}{[\text{gliceraldehído-3-fosfato}][P_i][\text{NAD}^+]}$$

COPY STATION

Observe que no se incluye el $[H^+]$ en Q. En los cálculos bioquímicos se da por supuesto que $[H^+]$ es una constante (10^{-7} M), incluyéndose esta constante en la definición de $\Delta G'^\circ$.

Cuando la razón de acción de masas es inferior a 1,0, su logaritmo natural tiene un signo negativo. El paso ❼, al consumir el producto del paso ❻ (1,3-bisfosfoglicerato), mantiene la [1,3-bisfosfoglicerato] relativamente baja en el estado estacionario por lo que Q del proceso de acoplamiento de energía global permanece bajo. Cuando Q es pequeño, la contribución de ln Q puede hacer que ΔG sea fuertemente negativa. Esta es, simplemente, otra forma de mostrar que las dos reacciones, pasos ❻ y ❼, están acopladas mediante un intermedio común.

El resultado final de estas reacciones acopladas, ambas reversibles en las condiciones celulares, es que la energía liberada en la oxidación de un grupo aldehído a carboxilato se conserva mediante la formación acoplada de ATP a partir de ADP y P_i. La formación de ATP por transferencia del grupo fosforilo a partir de un sustrato tal como el 1,3-bisfosfoglicerato se conoce como **fosforilación a nivel de sustrato** para distinguir este mecanismo de la **fosforilación ligada a la respiración.** La fosforilación a nivel de sustrato implica enzimas solubles e intermediarios químicos (1,3-bisfosfoglicerato en este caso). Las fosforilaciones ligadas a la respiración, por otro lado, implican enzimas de membrana y un gradiente transmembrana de protones (Capítulo 19).

Fosfoglicerato mutasa

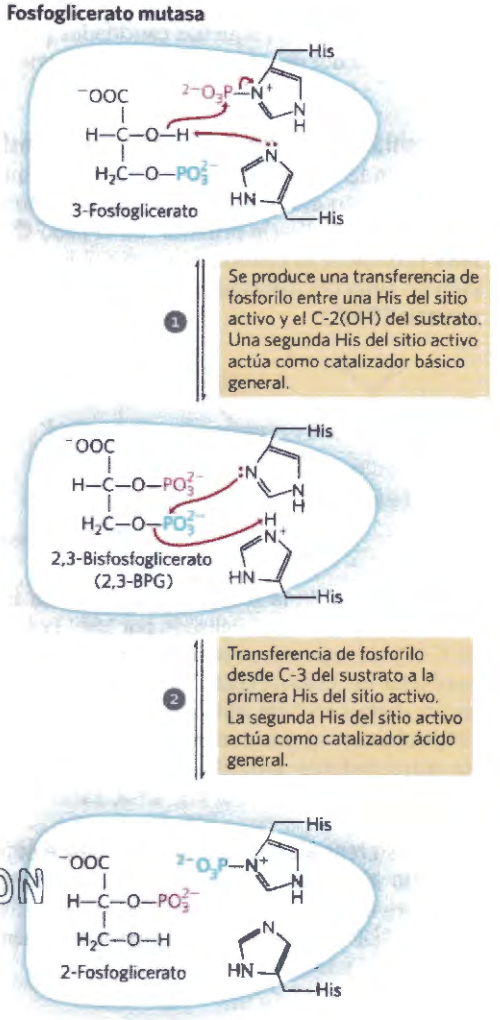
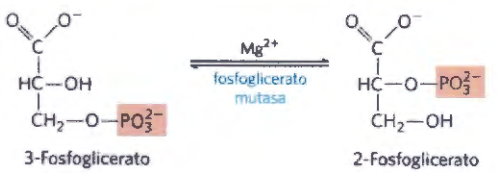


FIGURA MECANISMO 14-9 **Reacción de la fosfoglicerato mutasa.**

❽ Conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato El enzima **fosfoglicerato mutasa** cataliza un desplazamiento reversible del grupo fosforilo entre C-2 y C-3 del glicerato. El Mg^{2+} es esencial para esta reacción:

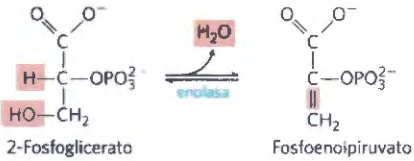


$\Delta G'^\circ = 4.4$ kJ/mol

La reacción tiene lugar en dos pasos **(Fig. 14-9)**. Un grupo fosforilo inicialmente unido a un residuo His de la mutasa es transferido al grupo hidroxilo en C-2 del 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Se transfiere a continuación el grupo fosforilo en C-3 del 2,3-BPG al mismo residuo His del enzima, produciendo 2-fosfoglicerato y regenerando el enzima fosforilado. La fosfoglicerato mutasa es inicialmente fosfo-

rilada por transferencia de fosforilo desde el 2,3-BPG que es necesario en pequeñas cantidades para iniciar el ciclo catalítico y es continuamente regenerado por ese ciclo.

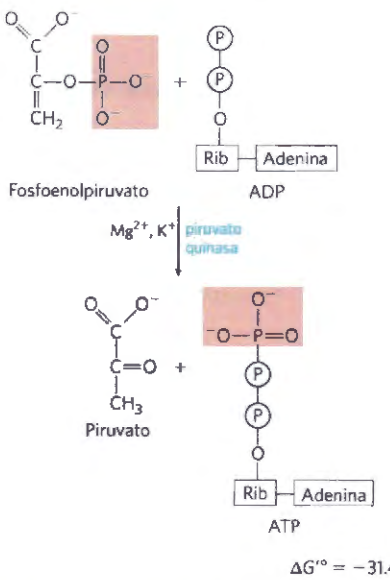
❾ Deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato En la segunda reacción glucolítica que genera un compuesto con potencial elevado de transferencia del grupo fosforilo (la primera fue el paso ❻) la **enolasa** promueve la eliminación reversible de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato, dando **fosfoenolpiruvato (PEP):**



$\Delta G'^{\circ} = 7.5$ kJ/mol

El mecanismo de la reacción de la enolasa implica un intermedio enólico estabilizado por Mg^{2+} (véase la Figura 6-27). La reacción convierte un compuesto con un potencial de transferencia de grupo fosforilo relativamente bajo ($\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del 2-fosfoglicerato es -17,6 kJ/mol) en uno con un potencial de transferencia de grupo fosforilo muy alto. ($\Delta G'^{\circ}$ de hidrólisis del PEP es -61,9 kJ/mol) (véase la Fig. 13-3, Tabla 13-6).

❿ Transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP El último paso de la glucólisis es la transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP catalizada por la **piruvato quinasa**, que requiere K^+ y también Mg^{2+} o Mn^{2+}:



$\Delta G'^{\circ} = -31.4$ kJ/mol

En esta fosforilación a nivel de sustrato, el producto **piruvato** aparece en primer lugar en su forma enol y a continuación se tautomeriza rápidamente y de forma no enzimática para dar la forma ceto, que es la que predomina a pH 7:



Piruvato (forma enol) Piruvato (forma ceto)

La reacción global tiene una variación de energía libre estándar negativa y grande, debido en gran medida a la conversión espontánea de la forma enol del piruvato en la forma ceto (véase la Fig. 13-3). Alrededor de la mitad de la energía liberada por la hidrólisis del PEP ($\Delta G'^{\circ}$ = -61,9 kJ/mol) se conserva en la formación del enlace fosfoanhídrido del ATP ($\Delta G'^{\circ}$= -30,5 kJ/mol), constituyendo el resto (-31,4 kJ/mol) una gran fuerza propulsora que empuja la reacción hacia la síntesis de ATP. La regulación de la piruvato quinasa se describe en el Capítulo 15.

El balance global muestra una ganancia neta de ATP

Podemos elaborar ahora un balance de la glucólisis en el que se dé cuenta (1) del destino del esqueleto carbonado de la glucosa, (2) de la entrada de P_i y ADP y producción de ATP, y (3) de la ruta de los electrones en las reacciones de oxidación-reducción. El primer miembro de la ecuación siguiente muestra todas las entradas de ATP, NAD^+, ADP y P_i (consulte la Fig. 14-2), mientras que el segundo miembro muestra todo lo que se produce (recuerde que la molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato):

COPY-STATION

$$\text{Glucosa} + 2\text{ATP} + 2\text{NAD}^+ + 4\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2 \text{ piruvato} + 2\text{ADP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Si simplificamos los términos que son comunes a ambos lados de la ecuación, obtenemos la ecuación global de la glucólisis en condiciones aeróbicas:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2 \text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Las dos moléculas de NADH formadas durante la glucólisis en el citosol son, en condiciones aeróbicas, reoxidadas a NAD^+ por transferencia de sus electrones a la cadena respiratoria que, en las células eucarióticas, está localizada en la mitocondria. La cadena de transporte electrónico pasa estos electrones a su destino final el O_2:

$$2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$

La transferencia de electrones desde el NADH al O2 en la mitocondria aporta la energía para la biosíntesis de ATP por fosforilación acoplada a la respiración (Capítulo 19).

En el proceso glucolítico global, se convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato (ruta del carbono). Dos moléculas de ADP y dos de P_i se convierten en dos moléculas de ATP (ruta de los grupos fosforilo). Cuatro electrones, en forma de dos iones hidruro, se transfieren desde dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato a dos de NAD^+ (ruta de los electrones).

La glucólisis está sometida a una regulación estricta

Durante sus estudios sobre la fermentación de la glucosa por la levadura Louis Pasteur descubrió que tanto la velocidad como la cantidad total de glucosa consumida eran mucho mayores en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. Estudios posteriores en el músculo pusieron de manifiesto la misma gran diferencia en la velocidad de la glucólisis en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La base bioquímica de este "efecto Pasteur" está clara ahora. El rendimiento en ATP de la glucólisis en condiciones anaeróbicas (2 ATP por molécula de glucosa) es mucho menor que el de la oxidación completa de la glucosa a CO_2 en condiciones aeróbicas (30 ó 32 ATP por molécula de glucosa; véase la Tabla 19-5). Para conseguir la misma cantidad de ATP se ha de consumir unas 15 veces más glucosa en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas.

El flujo de glucosa a través de la ruta glucolítica está regulado con el objetivo de conseguir niveles casi constantes de ATP (así como el suministro adecuado de intermediarios glucolíticos que se necesitan para procesos biosintéticos). El ajuste necesario de la velocidad de glucólisis se consigue mediante una compleja influencia recíproca entre consumo de ATP, regeneración de NADH y regulación alostérica de varios enzimas glucolíticos, entre ellos hexoquinasa, PFK-1 y piruvato quinasa así como por fluctuaciones segundo a segundo de la concentración de metabolitos clave que reflejan el equilibrio celular entre la producción y el consumo de ATP. En una escala de tiempo ligeramente más larga, la glucólisis está regulada por las hormonas glucagón, adrenalina e insulina y por cambios en la expresión de los genes de varios enzimas glucolíticos. Un caso de gran interés es el de la **glucólisis aeróbica** en tumores. El bioquímico alemán Otto Warburg fue el primero en observar, ya en 1928, que los tumores de casi todos los tipos tienen una glucólisis que funciona a una velocidad mucho mayor que en los otros tejidos *incluso con un buen suministro de oxígeno*. Este "efecto Warburg" es la base de diversos métodos de detección y tratamiento del cáncer (Recuadro 14-1).

Warburg, considerado por muchos como el bioquímico más preeminente de la primera mitad del siglo XX, aportó contribuciones básicas a muchas áreas de la bioquímica tales como la respiración, la fotosíntesis y la enzimología del metabolismo intermediario. En 1930 Warburg y colaboradores empezaron la purificación y cristalización de siete enzimas de la glucólisis. Desarrollaron una herramienta experimental que revolucionó los estudios bioquímicos del metabolismo oxidativo: el manómetro de Warburg, que medía directamente el consumo de oxígeno de los tejidos siguiendo los cambios en el volumen de gas permitiendo así la medida cuantitativa de cualquier enzima con actividad oxidasa.

Formado en la química de los glúcidos en el laboratorio del gran Emil Fischer (que obtuvo el Premio Nobel de Química en 1902), el mismo Warburg obtuvo el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1931. Diversos estudiantes y colegas de Warburg también consiguieron Premios Nobel: Otto Meyerhoff en 1922, Hans Krebs y Fritz Lipmann en 1953 y Hugo Theorell en 1955. El laboratorio de Meyerhoff formó a Lipmann y a otros galardonados con el Premio Nobel: Severo Ochoa (1959), André Lwoff (1965) y George Wald (1967).

La captación de glucosa es deficiente en la diabetes mellitus tipo 1

El metabolismo de la glucosa en los mamíferos está limitado por la velocidad de captación de glucosa por las células y su fosforilación por la hexoquinasa. En la captación de glucosa de la sangre interviene la familia de transportadores de glucosa GLUT (véase la Tabla 11-3). Los transportadores de los hepatocitos (GLUT1, GLUT2) y de las neuronas cerebrales (GLUT3) siempre están presentes en la membrana plasmática. Por el contrario, el principal transportador de glucosa en las células del músculo esquelético, músculo cardíaco y tejido adiposo (GLUT4) está secuestrado en pequeñas vesículas intracelulares y se desplaza a la membrana plasmática sólo en respuesta a una señal de insulina **(Fig. 14-10)**. Ya discutimos este mecanismo de señalización de la insulina en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12-20). Así, en el músculo esquelético, corazón y tejido adiposo, la captación y metabolismo de la glucosa depende de la liberación normal de insulina por las células β pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa sanguínea (véase la Fig. 23-27).

Los individuos con diabetes mellitus tipo 1 (también denominada diabetes dependiente de insulina) tienen demasiadas pocas células β con lo que no pueden liberar suficiente insulina para provocar la captación de glucosa por las células del músculo esquelético, corazón o tejido adiposo. Así, después de una comida rica en glúcidos la glucosa se acumula hasta niveles anormalmente elevados en la sangre, condición conocida como hiperglucemia. Incapaz de captar la glucosa, el músculo y el tejido graso utilizan los ácidos grasos de los triacilgliceroles almacenados como combustible principal. En el hígado, el acetil-CoA procedente de esta degradación de los ácidos grasos se convierte en "cuerpos cetónicos" (acetoacetato y β-hidroxibutirato) que se exportan y transportan a otros tejidos para su utilización como combustibles (Capítulo 17). Estos compuestos son de gran importancia para el cerebro que utiliza los cuerpos cetónicos como combustible alternativo cuando no hay glucosa a su disposición. (Los ácidos grasos no pueden pasar a través de la barrera hemato-encefálica por lo que no pueden utilizarse como combustible por las neuronas cerebrales).



Otto Warburg, 1883-1970 [Fuente: Science Photo Library/Science source.]

En la diabetes tipo 1 sin tratar, la sobreproducción de acetoacetato y β-hidroxibutirato conduce a su acumulación en la sangre y el consiguiente descenso del pH sanguíneo produce **cetoacidosis**, una situación que pone en peligro la vida. La inyección de insulina invierte esta secuencia de acontecimientos: GLUT4 se desplaza a las membranas plasmáticas de los adipocitos y hepatocitos, las células captan y fosforilan la glucosa y des-

RECUADRO 14-1 MEDICINA La alta velocidad de la glucólisis en los tumores sugiere dianas para la quimioterapia y facilita el diagnóstico

En muchos tipos de tumores encontrados en el hombre y otros animales, la captación de glucosa y la glucólisis tienen lugar unas 10 veces más rápidamente que en los tejidos no cancerosos normales. La mayoría de células tumorales crecen en condiciones hipóxicas (es decir, con un suministro limitado de oxígeno) porque, al menos inicialmente, carecen de la red de capilares para el suministro suficiente de oxígeno. Las células cancerosas que están localizadas a más de 100 a 200 μm de los capilares más próximos han de depender exclusivamente de la glucólisis (sin posterior oxidación del piruvato) para la mayor parte de su producción de ATP. El rendimiento energético (2 ATP por glucosa) es mucho más bajo que el obtenido por la oxidación completa del piruvato a CO_2 en las mitocondrias (alrededor de 30 ATP por glucosa; Capítulo 19). Así, para producir la misma cantidad de ATP, las células tumorales han de captar mucha más glucosa que las células normales convirtiéndola en piruvato y a continuación en lactato a medida que reciclan el NADH. Es probable que dos pasos tempranos en la transformación de una célula normal en tumoral sean (1) el cambio a una dependencia de la glucólisis para la producción de ATP y (2) el desarrollo de una tolerancia al bajo pH en el fluido extracelular (debido a la liberación del producto final de la glucólisis, el ácido láctico). En general, cuanto más agresivo es el tumor, mayor la velocidad de la glucólisis.

Este aumento de la glucólisis se consigue, al menos en parte, por un aumento de la síntesis de los enzimas glucolíticos y de los transportadores de la membrana plasmática GLUT1 y GLUT3 (véase la Tabla 11-3) que transportan glucosa al interior de las células. (Recuerde que GLUT1 y GLUT3 no dependen de la insulina). El **factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF-1)** es una proteína que actúa a nivel de la síntesis de mRNA para estimular la producción de al menos ocho enzimas glucolíticos y los transportadores de glucosa cuando el suministro de oxígeno es limitado (Fig. 1). Con la alta velocidad de glucólisis resultante, la célula tumoral puede sobrevivir en condiciones anaeróbicas hasta que el suministro de vasos sanguíneos es adecuado al crecimiento del tumor. Otra proteína inducida por HIF-1 es la hormona peptídica VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) que estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) hacia el tumor.

También hay pruebas de que la proteína supresora tumoral p53, que está mutada en muchos tipos de cáncer (véase la Sección 12.11), controla la síntesis y ensamblaje de proteínas mitocondriales esenciales para el paso de electrones al O_2. Las células con p53 mutante presentan defectos en el transporte electrónico mitocondrial por lo que están forzadas a depender más fuertemente de la glucólisis para la producción de ATP (Fig. 1).

Esta mayor dependencia de los tumores, en comparación con el tejido normal, respecto a la glucólisis sugiere una posibilidad de terapia anticancerosa: los inhibidores de la glucólisis podrían seleccionar y matar tumores al eliminar su suministro de ATP. Tres inhibidores de la hexoquinasa parecen prometedores como agentes quimioterápicos: 2-desoxiglucosa, lonidamina y 3-bromopiruvato. Al inhibir la formación de glucosa 6-fosfato, estos compuestos no sólo privan a las células tumorales del ATP producido por glucólisis sino que también impiden la formación de pentosas fosfato vía

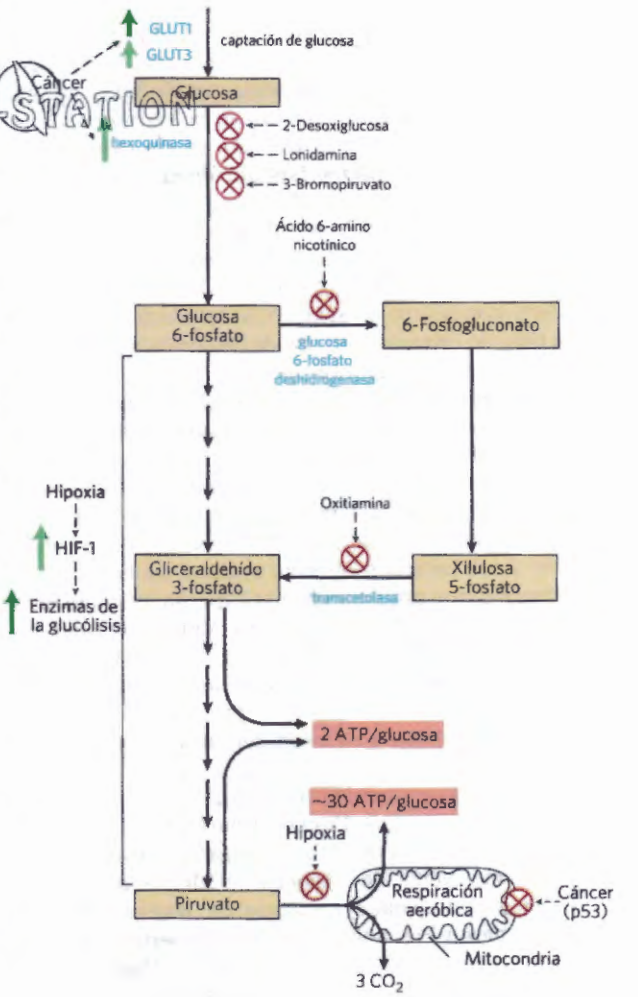
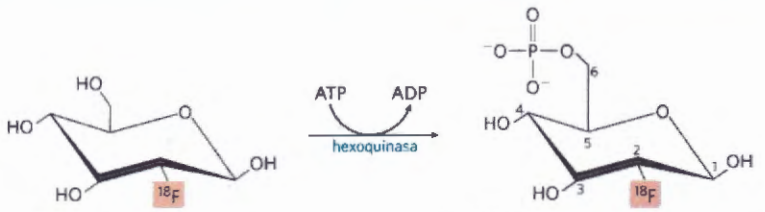


FIGURA 1 El metabolismo anaeróbico de la glucosa en las células tumorales produce mucho menos ATP (2 por glucosa) que la oxidación completa a CO_2 que tiene lugar en las células sanas en condiciones aeróbicas (~30 ATP por glucosa), con lo que una célula tumoral consume mucha más glucosa para producir la misma cantidad de ATP. En los tumores hay una sobreproducción de los transportadores de glucosa y de la mayoría de enzimas glucolíticos. Los compuestos que inhiben la hexoquinasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o transcetolasa bloquean la producción de ATP por la glucólisis privando, así, de energía a la célula cancerosa matándola.



[^{18}F]2-Fluoro-2-desoxiglucosa (FdG)

[^{18}F]6-Fosfo-2-fluoro-2-desoxiglucosa (6-Fosfo-FdG)

FIGURA 2 La fosforilación de 2-fluoro-2-desoxiglucosa marcada con ^{18}F por la hexoquinasa atrapa el FdG en las células (en forma de 6-fosfo-FdG), en donde su presencia se puede detectar por la emisión de positrones del ^{18}F.

la ruta de las pentosas fosfato, la cual también se inicia con glucosa 6-fosfato. Sin pentosas fosfato una célula no puede sintetizar los nucleótidos esenciales para la síntesis de DNA y RNA y así no puede crecer o dividirse. Otro medicamento anticanceroso ya aprobado para su utilización clínica es el imatinib (Gleevec), descrito en el Recuadro 12-4. Inhibe una tirosina quinasa específica, impidiendo el aumento de la síntesis de hexoquinasa normalmente desencadenado por aquella quinasa. El análogo de la tiamina, oxitiamina, que bloquea la acción de un enzima tipo transcetolasa que convierte la xilulosa 5-fosfato en gliceraldehído 3-fosfato (Fig. 1), se halla en ensayos preclínicos como fármaco anticanceroso.

La alta velocidad de la glucólisis en las células tumorales tiene también utilidad diagnóstica. Las tasas relativas a las que los tejidos captan la glucosa pueden utilizarse en algunos casos para señalar la localización de tumores. En la tomografía por emisión de positrones (PET), se inyecta a los individuos un análogo inocuo de la glucosa marcado isotópicamente que es captado pero no metabolizado por los tejidos. El compuesto marcado es 2-fluoro-desoxi-glucosa (FdG) en el que el grupo hidroxilo en el C-2 de la glucosa ha sido sustituido por ^{18}F (Fig. 2). Este compuesto se capta a través de los transportadores GLUT y es un buen sustrato para la hexoquinasa, pero no se puede convertir en el intermedio enediol de la reacción de la fosfohexosa isomerasa (véase la Fig. 14-5) y, por tanto, se acumula como 6-fosfo-FdG. El grado de acumulación depende de la velocidad de captación y fosforilación que, tal como se ha mencionado anteriormente, es, típicamente, unas 10 o más veces superior en los tumores que en el tejido normal. La desintegración del ^{18}F da positrones (dos por átomo de ^{18}F) que se pueden detectar por una serie de detectores sensibles colocados alrededor del cuerpo lo que permite la localización precisa del 6-fosfo-FdG acumulado (Fig. 3).

COPYSTATION

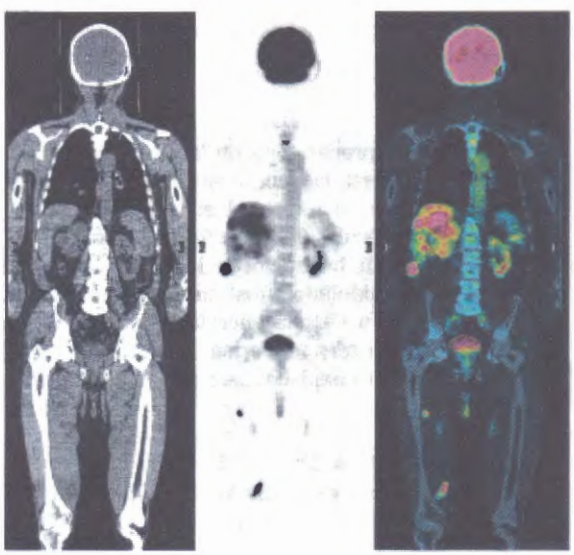


FIGURA 3 Detección de tejido canceroso por tomografía de emisión de positrones (PET). El paciente varón adulto ha sufrido eliminación quirúrgica de un cáncer de piel primario (melanoma maligno). La imagen de la izquierda, obtenida por tomografía computerizada de todo el cuerpo (escán CT), muestra la localización de los tejidos y huesos blandos. El panel central es un escán de PET después que el paciente haya ingerido 2-fluoro-2-desoxiglucosa marcada con ^{18}F (FdG). Las manchas oscuras indican regiones de elevada utilización de glucosa. Como era de esperar, el cerebro y la vejiga están marcados fuertemente (el cerebro porque utiliza la mayor parte de glucosa consumida por el cuerpo y la vejiga por que el 6-fosfo-FdG marcado con ^{18}F se excreta en la orina). Cuando la intensidad de la marca en el escán de PET se traduce en color falso (la intensidad aumenta del verde al amarillo y al rojo) y se superpone la imagen con el escán de CT, la imagen fusionada (derecha) revela cáncer en los huesos de la columna superior, en el hígado y en algunas regiones del músculo, todo ello resultado de la propagación cancerosa del melanoma maligno primario [Fuente: ISM/Phototake].

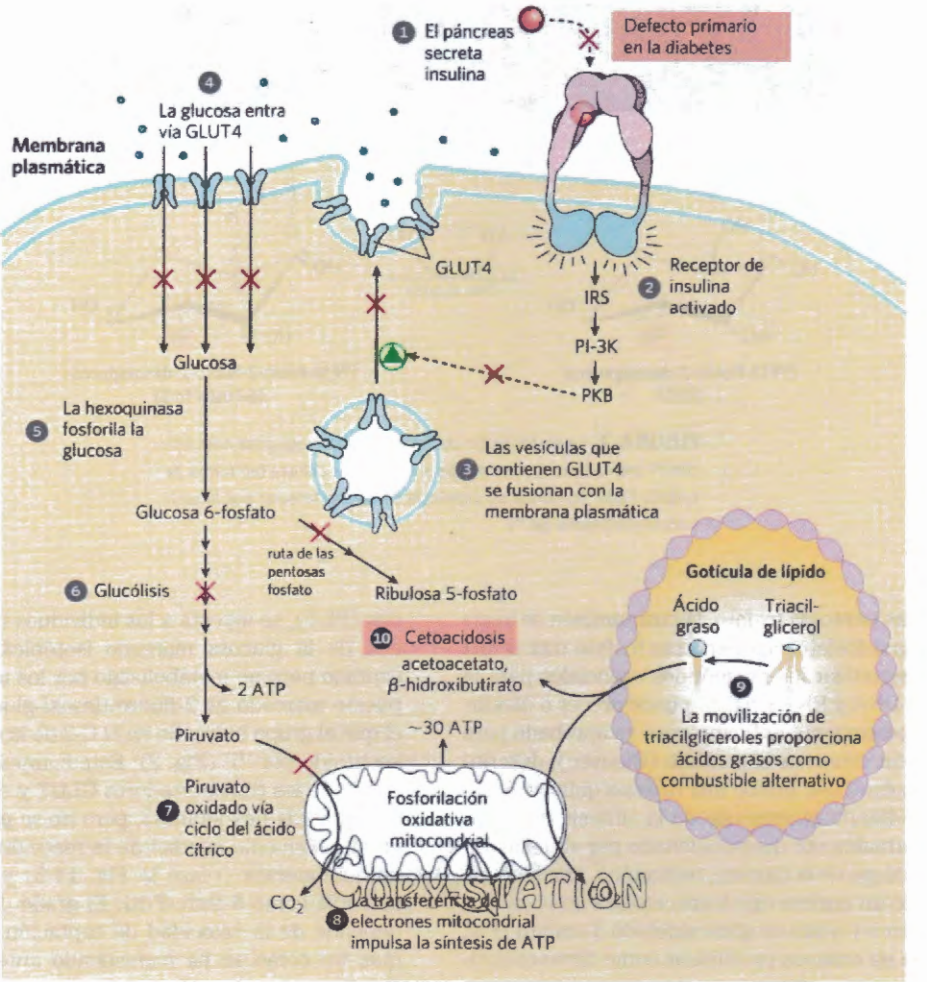


FIGURA 14-10 Efecto de la diabetes tipo 1 sobre el metabolismo de glúcidos y grasas en un adipocito. Normalmente, la insulina desencadena la inserción de transportadores GLUT4 en la membrana plasmática por fusión de vesículas que contienen GLUT4 con la membrana, lo que permite la captación de glucosa de la sangre. Cuando disminuyen los niveles sanguíneos de insulina, GLUT4 vuelve a ser secuestrado en vesículas por endocitosis. En la diabetes mellitus tipo 1 (dependiente de insulina), la inserción de GLUT4 en las membranas, así como otros procesos normalmente estimulados por la insulina, están inhibidos lo que se indica con una **X**. La falta de insulina impide la captación de glucosa vía GLUT4; la consecuencia es que las células se ven privadas de glucosa y la glucosa sanguínea está elevada. Carentes de glucosa para el suministro de energía, los adipocitos degradan triacilgliceroles almacenados en gotículas de grasa y suministran los ácidos grasos resultantes a otros tejidos para la producción mitocondrial de ATP. Se acumulan dos productos colaterales de la oxidación de ácidos grasos en el hígado (acetoacetato y β-hidroxibutirato, véase la p. 668) que se liberan a la sangre, proporcionando combustible para el cerebro pero al mismo tiempo disminuyendo el pH de la sangre, lo que produce cetoacidosis. La misma secuencia de acontecimientos tiene lugar en el músculo, excepto que los miocitos no almacenan triacilgliceroles; por el contrario captan ácidos grasos liberados por los adipocitos a la sangre. (Los detalles de la señalización de la insulina se discuten en la Sección 12.4).

cienden los niveles de glucosa sanguínea reduciéndose la producción de cuerpos cetónicos.

La diabetes mellitus tiene profundos efectos sobre el metabolismo tanto de glúcidos como de grasas. Volveremos a este tema en el Capítulo 23, después de considerar el metabolismo de los lípidos (Capítulos 17 y 21). ■

RESUMEN 14.1 Glucólisis

■ La glucólisis es una ruta metabólica casi universal por la que una molécula de glucosa se oxida a dos moléculas de piruvato conservando energía en forma de ATP y NADH.

■ Los 10 enzimas glucolíticos se hallan en el citosol, y los 10 intermediarios son compuestos fosforilados de tres o seis carbonos.

■ En la fase preparatoria de la glucólisis, se invierte ATP para convertir la glucosa en fructosa 1,6-bisfosfato. A continuación se rompe el enlace entre C-3 y C-4 dando dos moléculas de triosa fosfato.

■ En la fase de beneficios cada una de las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato derivadas de la glucosa se oxidan en C-1; la energía de esta reacción de oxidación se conserva en forma de un NADH y dos ATP por triosa fosfato oxidada. La ecuación neta del proceso global es:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2 \text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

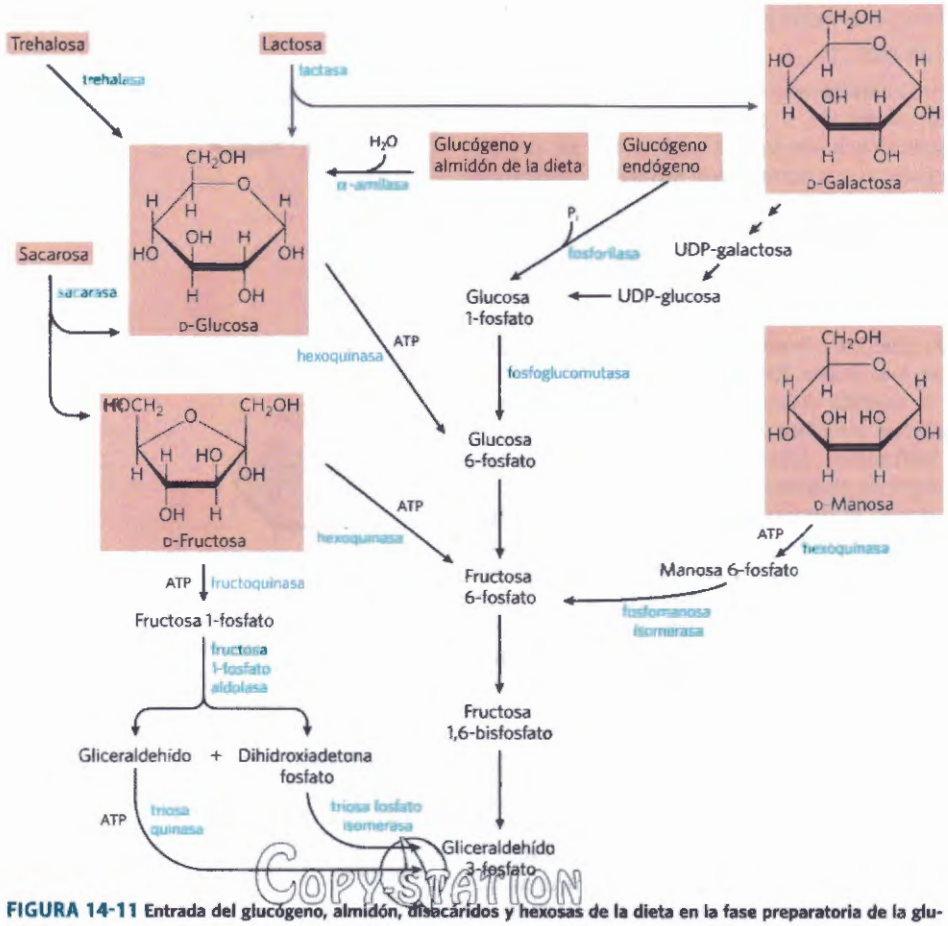


FIGURA 14-11 Entrada del glucógeno, almidón, disacáridos y hexosas de la dieta en la fase preparatoria de la glucólisis.

■ La glucólisis está regulada de forma muy estricta en coordinación con otras rutas productoras de energía para asegurar un suministro constante de ATP.

■ En la diabetes tipo 1, la captación defectuosa de glucosa por los tejidos muscular y adiposo tiene importantes efectos sobre el metabolismo de glúcidos y grasas.

14.2 Rutas alimentadoras de la glucólisis

Un gran número de glúcidos, aparte de la glucosa, entran en último término en la glucólisis, después de ser transformados en uno de los intermediarios glucolíticos. Los más significativos son los polisacáridos de almacenamiento glucógeno y almidón, ya sea de dentro de las células (endógenos) u obtenidos de la dieta; los disacáridos maltosa, lactosa, trehalosa y sacarosa y los monosacáridos fructosa, manosa y galactosa **(Fig. 14-11)**.

Los polisacáridos y disacáridos de la dieta se hidrolizan a monosacáridos

Para la mayoría de los humanos, el almidón es la principal fuente de glúcidos en la dieta (Fig. 14-11). La digestión comienza en la boca, donde la **α-amilasa** de la saliva hidroliza las uniones glucosídicas internas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) del almidón, dando lugar a fragmentos cortos de polisacáridos u oligosacáridos. (Observe que en esta reacción de *hidrólisis*, la especie atacante es el agua y no el P_i). En el estómago, la α-amilasa de la saliva es inactivada por el pH bajo, pero una segunda forma de α-amilasa, secretada por el páncreas al intestino delgado, continúa el proceso de degradación. La α-amilasa pancreática da lugar principalmente a maltosa y maltotriosa (los di- y trisacáridos de la glucosa) y oligosacáridos llamados dextrinas límite, fragmentos de amilopectina que contienen puntos de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 6$). La maltosa y las dextrinas son degradadas a glucosa por enzimas de las microvellosidades intestinales (los microvilli en forma de dedo de las células del epitelio intestinal, que aumentan en gran medida la superficie intestinal). El glucógeno de la dieta tiene básicamente la misma estructura que el almidón, siguiendo el mismo proceso de digestión.

Tal como se observó en el Capítulo 7, la mayoría de animales no pueden digerir la celulosa por falta del enzima celulasa que ataca los enlaces glucosídicos ($\beta 1 \rightarrow 4$) de la celulosa. En los rumiantes, el estómago extendido incluye una cámara en la que microorganismos simbióticos degradan la celulosa a moléculas de glucosa. Estos microorganismos utilizan la glucosa resultante en una fermentación anaeróbica que produce grandes cantidades de propionato. El propionato sirve como material de partida de la gluconeogénesis que da lugar a gran parte de la lactosa de la leche.

El glucógeno y el almidón endógenos se degradan mediante fosforólisis

El glucógeno almacenado en los tejidos animales (principalmente el hígado y el músculo esquelético), en microorganismos o en tejidos vegetales se pueden movilizar para su uso dentro de la propia célula mediante una reacción *fosforolítica* catalizada por la **glucógeno fosforilasa** (**almidón fosforilasa** en los vegetales) **(Fig. 14-12)**. Estos enzimas catalizan un ataque por el P_i sobre el enlace glucosídico ($\alpha 1 \rightarrow 4$) que une los dos últimos residuos de glucosa en un extremo no reductor generando glucosa 1-fosfato y un polímero una unidad de glucosa más corto. En la *fosforólisis*, se conserva parte de la energía del enlace glucosídico en el éster fosfato, glucosa 1-fosfato. La glucógeno fosforilasa (o la almidón fosforilasa) actúa repetitivamente hasta que alcanza un punto de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (véase la Fig. 7-13) en donde se detiene su acción. Un **enzima desramificante** elimina las ramificaciones. Los mecanismos y control de la degradación del glucógeno se describen detalladamente en el Capítulo 15.

La glucosa 1-fosfato producida por la glucógeno fosforilasa se convierte en glucosa 6-fosfato por la **fosfoglucomutasa,** que cataliza la reacción reversible

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$

La fosfoglucomutasa utiliza esencialmente el mismo mecanismo que la fosfoglicerato mutasa (Fig. 14-9): en ambas se produce un intermedio bisfosfato y el enzima se fosforila transitoriamente en cada ciclo catalítico. El término general **mutasa** se utiliza con los enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional desde una posición a otra en la misma molécula. Las mutasas son una subclase de las **isomerasas**, enzimas que interconvierten estereoisómeros o isómeros estructurales o posicionales (véase la Tabla 6-3). La glucosa 6-fosfato formada en la reacción de la fosfoglucomutasa puede entrar en la glucólisis o en otra vía tal como la de las pentosas fosfato, descrita en la Sección 14.5.

EJEMPLO PRÁCTICO 14-1 Ahorro de energía en la degradación del glucógeno por fosforólisis

Calcule el ahorro energético (en moléculas de ATP por monómero de glucosa) conseguido en la degradación del glucógeno por *fosforólisis* frente a la *hidrólisis* para empezar el proceso de la glucólisis.

Solución: La fosforólisis produce una glucosa fosforilada (glucosa 1-fosfato), que se convierte a continuación en glucosa 6-fosfato, sin gasto de la energía celular (1ATP) necesaria para la formación de glucosa 6-fosfato a partir de glucosa libre. Así, sólo se consume 1 ATP por monómero de glucosa en la fase preparatoria, en comparación con los 2 ATP cuando la glucólisis comienza con glucosa libre. La célula gana, por tanto, 3 ATP por monómero de glucosa (4 ATP producidos en la fase de beneficios menos 1 ATP utilizado en la fase preparatoria), en lugar de 2, lo que significa el ahorro de 1 ATP por monómero de glucosa.

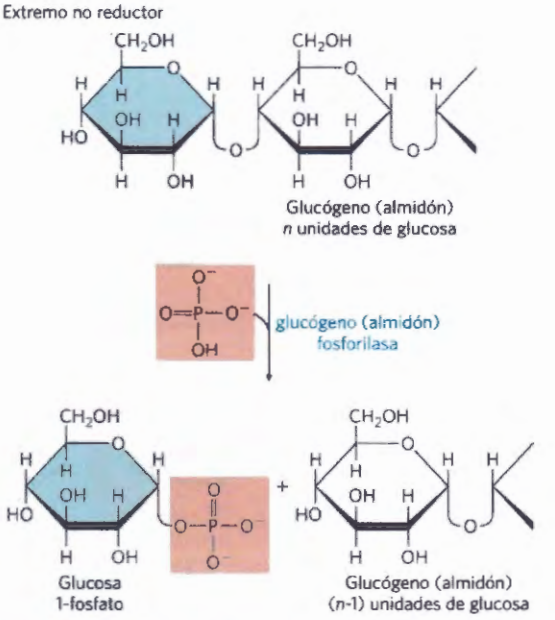


FIGURA 14-12 Degradación del glucógeno intracelular por la glucógeno fosforilasa. El enzima cataliza el ataque por fosfato inorgánico (rosa) sobre el residuo glucosilo terminal (azul) en el extremo no reductor de una molécula de glucógeno liberando glucosa 1-fosfato y generando una molécula de glucógeno con un residuo de glucosa menos. La reacción es una *fosforólisis* (no hidrólisis).

La degradación de los polisacáridos de la dieta tales como el glucógeno y el almidón en el tracto gastrointestinal por fosforólisis y no por hidrólisis no produciría ahorro energético: los azúcares fosfato no se transportan al interior de las células que recubren el intestino sino que se han de desfosforilar previamente a azúcar libre.

Los disacáridos no pueden entrar en las células sin haber sido previamente hidrolizados a monosacáridos. Los disacáridos y dextrinas intestinales son hidrolizados por enzimas unidos a la superficie externa de las células del epitelio intestinal:

$$\text{Dextrina} + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{dextrinasa}]{} n \text{ D-glucosa}$$

$$\text{Maltosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{maltasa}]{} 2 \text{ D-glucosa}$$

$$\text{Lactosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{lactasa}]{} \text{D-galactosa} + \text{D-glucosa}$$

$$\text{Sacarosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{sacarasa}]{} \text{D-fructosa} + \text{D-glucosa}$$

$$\text{Trehalosa} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{trehalasa}]{} 2 \text{ D-glucosa}$$

Los monosacáridos así formados se transportan activamente al interior de las células epiteliales (véase la Fig. 11-41), desde las que pasan a la sangre siendo transportados a diversos tejidos. Allí son fosforilados y canalizados hacia la secuencia glucolítica.

La **intolerancia a la lactosa**, frecuente entre los adultos de la mayoría de razas humanas con excepción de los habitantes del norte de Europa y algunas partes de África, se debe a la desaparición después de la infancia de la mayor parte o de toda la actividad lactasa de las células del epitelio intestinal. Sin lactasa intestinal la lactosa no puede ser digerida y absorbida completamente en el intestino delgado y pasa al intestino grueso donde es convertida por las bacterias en productos tóxicos que causan espasmos abdominales y

diarrea. El problema se complica aún más porque la lactosa no digerida y sus metabolitos aumentan la osmolaridad del contenido del intestino lo que favorece la retención de agua en el intestino. En muchas partes del mundo en las que la intolerancia a la lactosa es frecuente, los adultos dejan de ingerir leche como alimento, aunque se pueden encontrar comercialmente en algunos países productos lácteos digeridos con lactasa. En ciertas enfermedades humanas faltan todas o gran parte de las disacaridasas intestinales. En estos casos se alivian a veces los problemas digestivos desencadenados por los disacáridos intestinales mediante una dieta controlada. ■

Otros monosacáridos pueden entrar en diferentes puntos de la ruta glucolítica

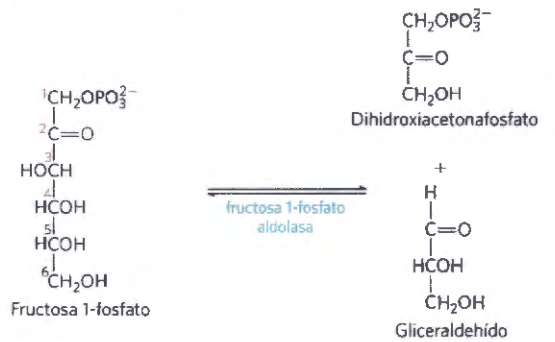
En la mayoría de organismos otras hexosas aparte de la glucosa pueden entrar en la glucólisis después de ser transformadas en un derivado fosforilado. La D-fructosa presente en su forma libre en muchas frutas y formada en la hidrólisis de la sacarosa en el intestino delgado de los vertebrados, puede ser fosforilada por la hexoquinasa:

$$\text{Fructosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{fructosa 6-fosfato}$$

En los músculos y riñón ésta es una ruta importante de entrada de la fructosa en la glucólisis. En el hígado, la fructosa entra por una ruta diferente. El enzima hepático **fructoquinasa** cataliza la fosforilación de la fructosa, no en el C-6 sino en el C-1:

$$\text{Fructosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{fructosa 1-fosfato}$$

La fructosa 1-fosfato se rompe a continuación formando gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato por la **fructosa 1-fosfato aldolasa**:



La dihidroxiacetona fosfato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato por el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa. El gliceraldehído es fosforilado por el ATP y la **triosa quinasa** a gliceraldehído 3-fosfato:

$$\text{Gliceraldehído} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{gliceraldehído 3-fosfato} + \text{ADP}$$

De este modo los dos productos de la hidrólisis de la fructosa 1-fosfato entran en la vía glucolítica en forma de gliceraldehído 3-fosfato.

La D-galactosa, un producto de la hidrólisis del disacárido lactosa (azúcar de la leche), pasa por la sangre del intestino al hígado en donde se fosforila primeramente en C-1 a expensas del ATP por la acción del enzima **galactoquinasa:**

$$\text{Galactosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{galactosa 1-fosfato} + \text{ADP}$$

La galactosa 1-fosfato se convierte seguidamente en su epímero en C-4 glucosa 1-fosfato mediante un conjunto de reacciones en las que la **uridina difosfato** (UDP) funciona como un transportador de tipo coenzimático de grupos hexosa **(Fig. 14-13)**. La epimerización implica primero la oxidación del grupo –OH en C-4 a una cetona, a continuación la reducción de la cetona a un –OH con inversión de la configuración en C-4. El

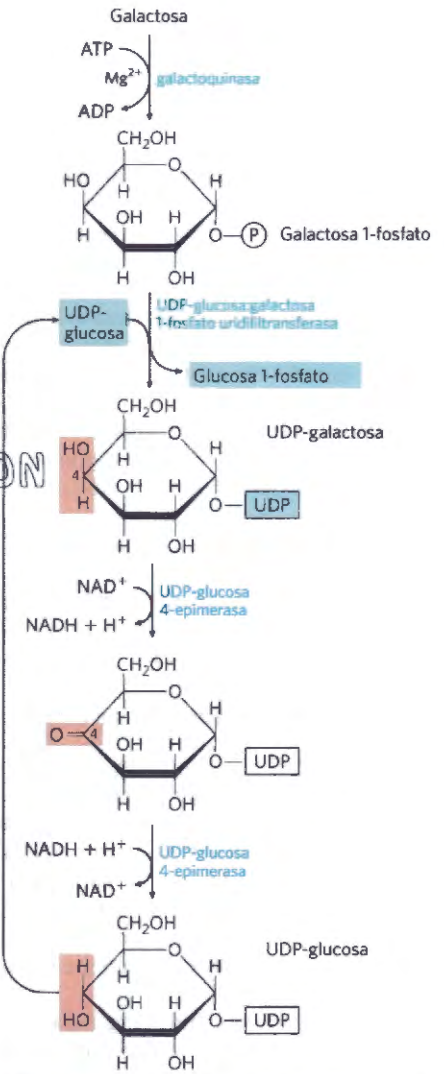
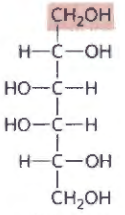


FIGURA 14-13 Conversión de la galactosa en glucosa 1-fosfato. La conversión transcurre a través de un derivado azúcar-nucleótido, UDP-galactosa, que se forma cuando la galactosa-1-fosfato desplaza la glucosa 1-fosfato de la UDP-glucosa. La UDP-galactosa se convierte seguidamente en UDP-glucosa por la UDP-glucosa 4-epimerasa en una reacción que implica la oxidación del C-4 (rosa) por el NAD^+ y, a continuación, la reducción del C-4 por el NADH; el resultado es la inversión de la configuración en C-4. La UDP-glucosa se recicla a través de otra vuelta de la misma reacción. El efecto neto de este ciclo es la conversión de la galactosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato; no hay producción o consumo neto de UDP-galactosa o UDP-glucosa.

COPY-STATION

NAD es el cofactor tanto para la oxidación como para la reducción.

Un defecto en cualquiera de los tres enzimas produce **galactosemia** en los humanos. En la galactosemia por deficiencia de galactoquinasa, se encuentran concentraciones elevadas de galactosa en la sangre y en la orina. Los recién nacidos desarrollan cataratas debido al depósito de galactitol, un metabolito de la galactosa, en el cristalino.



D-Galactitol

Los demás síntomas en esta enfermedad son relativamente suaves y una limitación estricta de la galactosa en la dieta disminuye notablemente su gravedad.

La galactosemia debida a déficit de transferasa es más grave; se caracterizada por poco crecimiento en los niños, anomalías del habla, deficiencia mental y lesión hepática que puede ser fatal, incluso cuando se suprime la galactosa de la dieta. La galactosemia debida a déficit de epimerasa conduce a síntomas similares pero es menos grave cuando se controla cuidadosamente la galactosa de la dieta. ■

La D-manosa liberada de la digestión de diversos polisacáridos y glucoproteínas presentes en el alimento puede ser fosforilada en C-6 por la hexoquinasa:

$$\text{Manosa} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{manosa 6-fosfato} + \text{ADP}$$

La manosa 6-fosfato se isomeriza por la acción de la **fosfomanosa isomerasa**, dando fructosa 6-fosfato que es un intermediario de la glucólisis.

RESUMEN 14.2 Rutas que alimentan la glucólisis

■ El glucógeno y el almidón endógenos, las formas de almacenamiento de la glucosa, entran en la glucólisis en un proceso de dos pasos. La rotura fosforolítica de un residuo de glucosa de un extremo del polímero que forma glucosa 1-fosfato es catalizada por la glucógeno fosforilasa o la almidón fosforilasa. A continuación la fosfoglucomutasa convierte la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato que puede entrar en la glucólisis.

■ Los polisacáridos y disacáridos ingeridos se convierten en monosacáridos por acción de enzimas hidrolíticos del intestino y, a continuación, los monosacáridos entran en las células intestinales y se transportan al hígado o a otros tejidos.

■ Diversas D-hexosas, entre ellas fructosa, galactosa y manosa, se pueden canalizar hacia la glucólisis. Cada una es fosforilada y a continuación se convierte en glucosa 6-fosfato o en fructosa 6-fosfato.

■ La conversión de galactosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato se hace a través de dos intermediarios que son derivados de nucleótidos: UDP-galactosa y UDP-glucosa. Defectos genéticos en cualquiera de los tres enzimas que catalizan la conversión de galactosa en glucosa 1-fosfato son causa de galactosemias de gravedad variable.

14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: fermentación

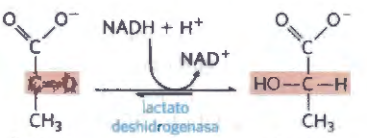
En condiciones aeróbicas el piruvato formado en el último paso de la glucólisis se oxida a acetato (acetil-CoA), el cual entra en el ciclo del ácido cítrico y se oxida a CO_2 y H_2O. El NADH formado por la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato se reoxida finalmente a NAD^+ mediante el paso final de sus electrones al O_2 en el proceso de la respiración mitocondrial. No obstante, en condiciones de hipoxia (baja concentración de oxígeno), como en los músculos esqueléticos muy activos, en las plantas sumergidas, en tumores sólidos o en las bacterias del ácido láctico, el NADH generado en la glucólisis no puede ser reoxidado por el O_2. La incapacidad para regenerar NAD^+ dejaría a la célula sin aceptor de electrones para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato, con lo que se detendrían las reacciones de la glucólisis que producen energía. Por tanto, se ha de regenerar el NAD^+ de forma diferente.

Las primeras células vivieron en una atmósfera casi sin oxígeno, por lo que tuvieron que desarrollar estrategias para obtener energía a partir de moléculas de combustible en condiciones anaeróbicas. La mayoría de los organismos modernos han mantenido la capacidad de regenerar continuamente el NAD^+ durante la glucólisis anaeróbica por medio de la transferencia de los electrones desde el NADH para formar un producto final reducido tal como el lactato o el etanol.

COPY STATION

El piruvato es el aceptor electrónico terminal en la fermentación láctica

Cuando a los tejidos animales no se les puede suministrar oxígeno suficiente para mantener la oxidación aeróbica del piruvato y del NADH producidos en la glucólisis, el NAD^+ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a **lactato.** Tal como ya se ha mencionado anteriormente ciertos tejidos y tipos celulares (tales como los eritrocitos que no tienen mitocondrias y, por tanto, no pueden oxidar el piruvato a CO_2) producen lactato a partir de la glucosa incluso en condiciones aeróbicas. La reducción del piruvato en esta ruta está catalizada por la **lactato deshidrogenasa**, que forma el isómero L del lactato a pH 7:



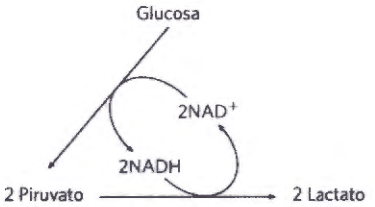
Piruvato L-Lactato

$\Delta G'^{\circ} = -25.1$ kJ/mol

El equilibrio global de esta reacción favorece fuertemente la formación de lactato, tal como se demuestra por la gran variación negativa de la energía libre estándar.

En la glucólisis la deshidrogenación de las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato procedentes de

cada molécula de glucosa transforma dos moléculas de NAD^+ en dos de NADH. Debido a que la reducción de dos moléculas de piruvato a dos de lactato regenera dos moléculas de NAD^+, no hay cambio neto de NAD^+ o de NADH:

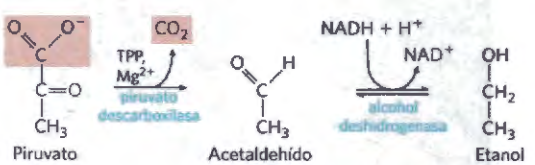


El lactato formado por músculos esqueléticos activos (o por eritrocitos) puede reciclarse; se transporta por la sangre al hígado en donde se convierte en glucosa durante la recuperación de la actividad muscular vigorosa. Cuando se produce lactato en grandes cantidades durante la contracción muscular vigorosa (durante un sprint, por ejemplo), la acidificación resultante de la ionización del ácido láctico en el músculo y en la sangre limita los períodos de actividad enérgica. Los atletas mejor preparados no pueden esprintar a velocidad límite durante más de un minuto (Recuadro 14-2).

Aunque hay dos pasos de oxidación-reducción en la conversión de la glucosa en lactato, no hay cambio neto en el estado de oxidación del carbono; en la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y en el ácido láctico ($C_3H_6O_3$), la proporción H:C es la misma. No obstante, se ha extraído parte de la energía de la molécula de glucosa en su conversión a lactato, suficiente para dar un rendimiento neto de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida. **Fermentación** es el término general para este tipo de procesos que extraen energía (en forma de ATP) pero que no consumen oxígeno o cambian las concentraciones de NAD^+ o NADH. Las fermentaciones son debidas a una variedad muy elevada de organismos, muchos de los cuales ocupan nichos anaeróbicos, formando una gran variedad de productos finales de los que algunos pueden ser utilizados comercialmente.

El etanol es el producto reducido en la fermentación alcohólica

La levadura y otros microorganismos fermentan la glucosa a etanol y CO_2, en lugar de formar lactato. La glucosa se convierte en piruvato durante la glucólisis y el piruvato se transforma en etanol y CO_2 en un proceso de dos pasos.



En el primer paso, el piruvato se descarboxila en una reacción irreversible catalizada por la **piruvato descarboxilasa**. Esta reacción es una descarboxilación simple que no supone la oxidación neta del piruvato. La piruvato descarboxilasa necesita Mg^{2+} y tiene un coenzima unido muy fuertemente, la tiamina pirofosfato, que

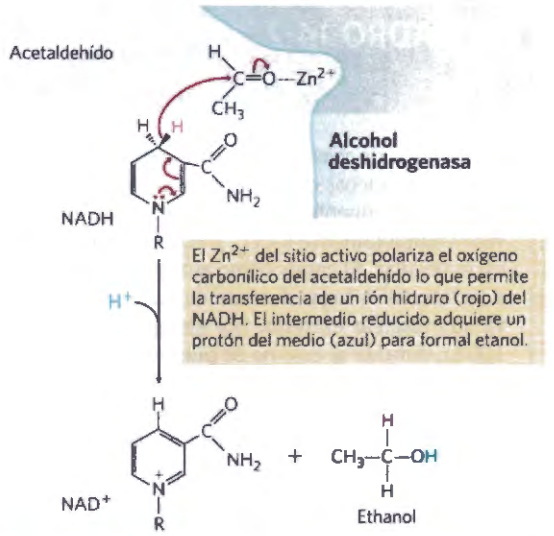


FIGURA MECANISMO 14-14 **Reacción de la alcohol deshidrogenasa.**

se describe con mayor detalle más adelante. En el segundo paso, el acetaldehído se reduce a etanol a través de la acción de la **alcohol deshidrogenasa** mediante el poder reductor proporcionado por el NADH procedente de la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato. Esta reacción es un caso bien estudiado de transferencia de hidruro a partir del NADH **(Fig. 14-14)**. Por lo tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica son el etanol y el CO_2 y la ecuación global es:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Al igual que en la fermentación del ácido láctico no hay cambio neto en la razón de átomos de hidrógeno a átomos de carbono cuando se fermenta la glucosa, (razón H:C = 12/6 = 2) a dos etanol y dos CO_2 (razón combinada H:C = 12/6 = 2). En todas las fermentaciones la razón H:C de los reactivos y los productos permanece inalterada.

La piruvato descarboxilasa se encuentra en las levaduras de cerveza y de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) y en todos los organismos que dan lugar a la fermentan glucosa a etanol, entre ellos algunas plantas. El CO_2 producido por la descarboxilación del piruvato en la levadura de cerveza es el responsable de la gasificación característica del champán. En el antiguo arte de la producción de cerveza intervienen diversos procesos enzimáticos aparte de las reacciones de la fermentación alcohólica (Recuadro 14-3). En la panificación, el CO_2 liberado por la piruvato descarboxilasa cuando se mezcla la levadura con un azúcar fermentable hace que suba la masa. Este enzima está ausente de los tejidos de los vertebrados y de otros organismos que llevan a cabo la fermentación del ácido láctico.

La alcohol deshidrogenasa está presente en muchos organismos que metabolizan etanol, entre ellos el hombre. En el hígado cataliza la oxidación del etanol, ya sea el ingerido o el producido por los microorganismos intestinales con la reducción concomitante del NAD^+ a NADH. En este caso la reacción transcurre en la dirección opuesta a la que se da en la producción de etanol por la fermentación.

RECUADRO 14-2 Atletas, caimanes y celacantos: la glucólisis en condiciones limitantes de oxígeno

La mayoría de vertebrados son organismos esencialmente aeróbicos; convierten la glucosa en piruvato mediante la glucólisis, a continuación oxidan el piruvato completamente a CO_2, y H_2O utilizando el oxígeno molecular. El catabolismo anaeróbico de la glucosa a lactato tiene lugar durante cortas acciones de actividad muscular extrema, por ejemplo en un sprint de 100 m, durante el cual no se puede transportar oxígeno al músculo de forma suficientemente rápida para oxidar el piruvato. En su lugar los músculos usan la glucosa almacenada (glucógeno) como combustible para generar ATP por fermentación, con lactato como producto final. En un sprint, el lactato sanguíneo aumenta hasta concentraciones elevadas y vuelve a convertirse lentamente en glucosa por gluconeogénesis en el hígado en el posterior período de descanso o de recuperación. En este período el oxígeno se consume a un ritmo que disminuye gradualmente hasta que la respiración vuelve a ser normal. El exceso de oxígeno consumido durante el período de recuperación representa el pago de la deuda de oxígeno. Ésta es la cantidad de oxígeno que se precisa para suministrar ATP para la gluconeogénesis durante la recuperación de la respiración a fin de regenerar el glucógeno "tomado en préstamo" del hígado y músculo para llevar a cabo la intensa actividad muscular del sprint. El ciclo de reacciones en el que se incluye la conversión de glucosa en lactato en el músculo y la conversión de lactato en glucosa en el hígado se denomina ciclo de Cori, en honor de Carl y Gerty Cori, cuyos estudios en las décadas de 1930 y 1940 clarificaron la ruta y su papel (véase el Recuadro 15-4).

Los sistemas circulatorios de muchos vertebrados pequeños pueden transportar oxígeno a sus músculos con suficiente rapidez para evitar el tener que usar el glucógeno muscular anaeróbicamente. Por ejemplo, las aves migratorias acostumbran a cubrir grandes distancias a alta velocidad sin descanso y sin provocar una deuda de oxígeno. Muchos animales corredores de tamaño moderado también mantienen un metabolismo esencialmente aeróbico en su musculatura esquelética. Pero en los animales grandes, hombre incluido, el sistema circulatorio no puede mantener completamente el metabolismo aeróbico de los músculos esqueléticos durante períodos largos de actividad muscular intensa. Estos animales acostumbran a moverse lentamente en circunstancias normales y sólo realizan actividades musculares intensas en las emergencias más graves, dado que tales explosiones de fuerte actividad requieren largos períodos de recuperación para cancelar la deuda de oxígeno.

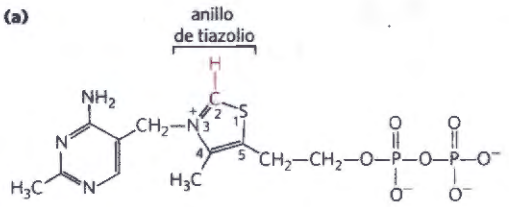
Los caimanes y cocodrilos, por ejemplo, son normalmente animales perezosos y apáticos. No obstante, cuando se les provoca, son capaces de cargas rápidas fulminantes y de peligrosos latigazos con sus colas poderosas. Estas explosiones intensas de actividad son cortas y han de ir seguidas de largos períodos de recuperación. Los rápidos movimientos de emergencia requieren fermentación a ácido láctico para generar ATP en los músculos esqueléticos. Los depósitos de glucógeno musculares se gastan rápidamente en la actividad muscular intensa y el lactato alcanza concentraciones muy elevadas en los miocitos y en el fluido extracelular. Mientras que un atleta entrenado puede recuperarse de un sprint de 100 m en 30 minutos o menos, un caimán puede necesitar muchas horas de descanso y consumo extra de oxígeno para eliminar el exceso de lactato de su sangre y regenerar el glucógeno muscular después de una actividad violenta.

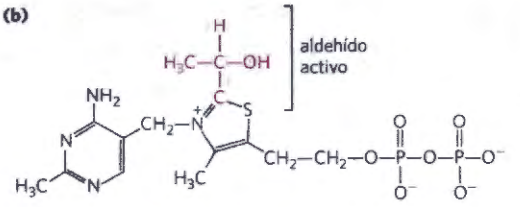
Otros animales grandes, tales como los elefantes y los rinocerontes, tienen características metabólicas similares lo mismo que los mamíferos buceadores tales como las ballenas y las focas. Los dinosaurios y otros grandes animales actualmente extinguidos probablemente tenían que depender de la fermentación a lactato para el suministro de energía para la actividad muscular, seguida de períodos de recuperación muy largos en los que eran vulnerables al ataque por depredadores más pequeños pero mejor capacitados para utilizar oxígeno y por lo tanto, mejor adaptados a una actividad muscular continua y sostenida.

Las exploraciones marinas en aguas abisales han descubierto la existencia de muchas especies en las grandes profundidades oceánicas en donde la concentración de oxígeno es casi nula. Por ejemplo, el celacanto primitivo, un gran pez que vive a profundidades de 4.000 m o más en zonas cercanas a la costa sudafricana, tiene un metabolismo esencialmente anaeróbico en todos sus tejidos. Convierte glúcidos en lactato y otros productos, la mayoría de los cuales han de ser excretados. Algunos vertebrados marinos fermentan la glucosa a etanol y CO_2 con el fin de obtener ATP.



[Fuente: John Zocco/Shutterstock.]





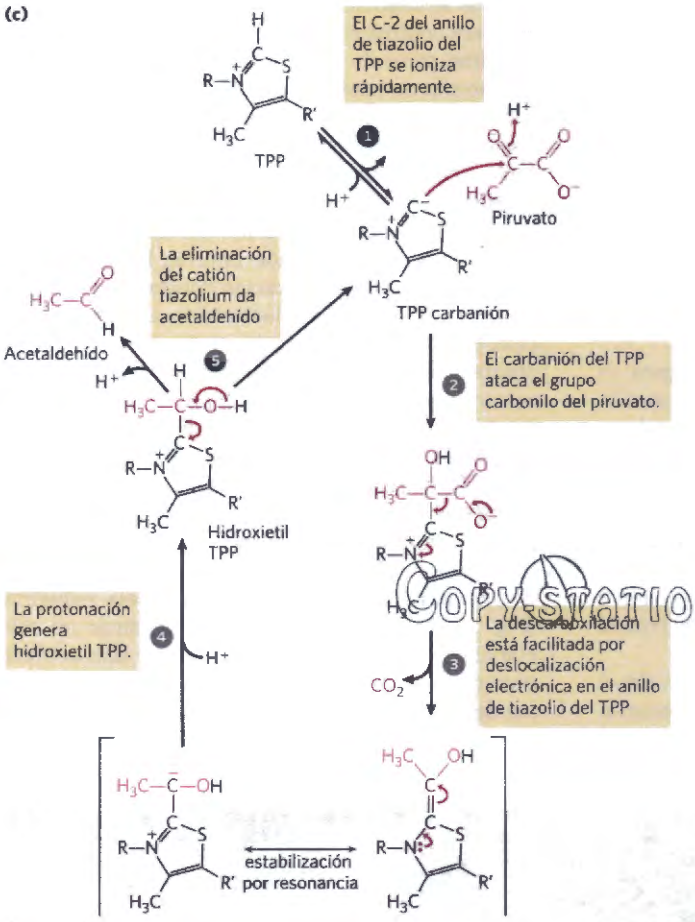


FIGURA MECANISMO 14-15 Tiamina pirofosfato (TPP) y su papel en la descarboxilación del piruvato. **(a)** El TPP es la forma coenzimática de la vitamina B_1 (tiamina). El átomo de carbono reactivo en el anillo de tiazolio del TPP se muestra en rojo. En la reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa, se transportan transitoriamente dos de los tres carbonos del piruvato sobre el TPP en forma de grupo hidroxietilo, o " acetaldehído activo" **(b)**, que es liberado a continuación como acetaldehído. **(c)** El anillo de tiazolio del TPP estabiliza los intermedios carbanión al proporcionar una estructura electrofílica (deficiente en electrones) en la que los electrones del carbanión pueden deslocalizarse por resonancia. A las estructuras con estas propiedades se las llama frecuentemente "sumideros de electrones" y juegan un papel en muchas reacciones bioquímicas; en este caso facilita la rotura de un enlace carbono-carbono.

COPYSTATION

La tiamina pirofosfato transporta grupos "aldehído activos"

La reacción de la piruvato descarboxilasa representa nuestro primer contacto con la **tiamina pirofosfato (TPP) (Fig. 14-15)**, coenzima que proviene de la vitamina B_1. La ausencia de vitamina B_1 en la dieta humana lleva a la enfermedad conocida como beriberi caracterizada por una acumulación de fluidos corporales (hinchamiento), dolor, parálisis y en último término muerte. ■

La tiamina pirofosfato juega un papel importante en la rotura de enlaces adyacentes a un grupo carbonilo, tales como la descarboxilación de los α-cetoácidos, y en reordenamientos químicos en los que hay transferencia de un grupo aldehído activado desde un átomo de carbono a otro (Tabla 14-1). La parte funcional del TPP, el anillo de tiazolio, tiene un protón en C-2 relativamente ácido. La pérdida de este protón produce un carbanión que es la especie activa en las reacciones dependientes de TPP (Fig. 14-15). El carbanión se adiciona fácilmente a grupos carbonilo, con lo que el anillo de tiazolio está, de este modo, en situación para actuar como "sumidero electrónico" que facilita en gran manera reacciones tales como la descarboxilación catalizada por la piruvato descarboxilasa.

Algunas fermentaciones microbianas dan lugar a algunos alimentos comunes y productos químicos industriales

Hace milenios que nuestros antepasados aprendieron a utilizar las fermentaciones en la producción y conservación de alimentos. Ciertos microorganismos presentes en los productos alimenticios crudos fermentan los glúcidos y dan lugar a productos metabólicos que dan a los alimentos sus formas, texturas y gustos característicos. El yogur, ya conocido en los tiempos bíblicos, se produce cuando la bacteria *Lactobacillus bulgaricus* fermenta los azúcares de la leche produciendo ácido láctico; el correspondiente descenso de pH hace que

RECUADRO 14-3 Fermentaciones alcohólicas: elaboración de la cerveza y producción de biocombustibles

La elaboración de la cerveza fue una ciencia que la humanidad aprendió en épocas tempranas y que después refinó para su producción en gran escala. La cerveza se prepara por fermentación etanólica de los glúcidos presentes en los granos (semillas) de cereales tales como la cebada por parte de enzimas glucolíticos de la levadura. Los glúcidos, básicamente polisacáridos, deben ser previamente degradados a di y monosacáridos. En un proceso denominado malteado se deja que las semillas de cebada germinen hasta que forman los enzimas hidrolíticos requeridos para degradar sus polisacáridos, momento en el que se detiene la germinación mediante calefacción controlada. El producto es la malta, la cual contiene enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β de la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular de las cáscaras de cebada, además de enzimas tales como la α-amilasa y la maltasa.

En el siguiente paso el cervecero prepara el mosto, que es el medio nutriente necesario para la posterior fermentación por las células de levadura. La malta se mezcla con agua y se tritura. Esto permite que los enzimas formados durante el proceso de malteado actúen sobre los polisacáridos del cereal formando maltosa, glucosa y otros azúcares sencillos solubles en el medio acuoso. La materia celular restante se separa seguidamente y el líquido se hierve con lúpulo para darle sabor. A continuación el líquido se enfría y se airea.

Se añaden ahora las células de levadura. En el caldo aeróbico las levaduras crecen y se reproducen muy rápidamente, utilizando energía de los azúcares presentes. En esta fase no se forma etanol debido a que la levadura, con amplio suministro de oxígeno, oxida el piruvato formado por la glucólisis a CO_2 y H_2O vía ciclo del ácido cítrico. Cuando se ha consumido todo el oxígeno disuelto del recipiente, las células de levadura pasan a metabolizar el azúcar de forma anaeróbica. A partir de este punto la levadura fermenta los azúcares a etanol y CO_2. El proceso de fermentación viene controlado en parte por la concentración de etanol formado, por el pH y por la cantidad de azúcar restante. Una vez se ha detenido la fermentación se separan las células y la cerveza "cruda" está lista para el tratamiento final.

En los últimos pasos de la elaboración de la cerveza, se ajusta la cantidad de espuma que proviene de proteínas disueltas. Esto se controla normalmente mediante la acción de enzimas proteolíticos que aparecen en el proceso de malteado. Si estos enzimas actúan durante demasiado tiempo la cerveza formará poca espuma; si no actúan durante un tiempo suficiente la cerveza no será cristalina cuando esté fría. A veces se añaden enzimas proteolíticos de otro origen para controlar la cantidad de espuma.

Gran parte de la tecnología desarrollada para la producción de bebidas alcohólicas a gran escala está encontrando en la actualidad aplicación a un problema totalmente diferente: la producción de etanol como combustible renovable. Con la desaparición continuada de las reservas conocidas de combustibles fósiles y el coste creciente del combustible para los motores de combustión interna, hay un interés cada vez mayor en la utilización del etanol como combustible sustituto o complementario. La ventaja principal del etanol como combustible es que se puede producir de fuentes *baratas* y *renovables* ricas en sacarosa, almidón o celulosa (el almidón del maíz o del trigo, la sacarosa de la remolacha o la caña de azúcar y la celulosa de la paja, desechos e la industria forestal o de residuos sólidos urbanos). Típicamente, la materia prima (material de partida) se convierte primero de forma química en monosacáridos, a continuación se utiliza para alimentar una cepa robusta de levadura en un fermentador a escala industrial (Fig. 1). La fermentación puede producir no sólo etanol para utilizarlo como combustible sino también productos secundarios tales como proteínas que se pueden utilizar como alimento para animales.

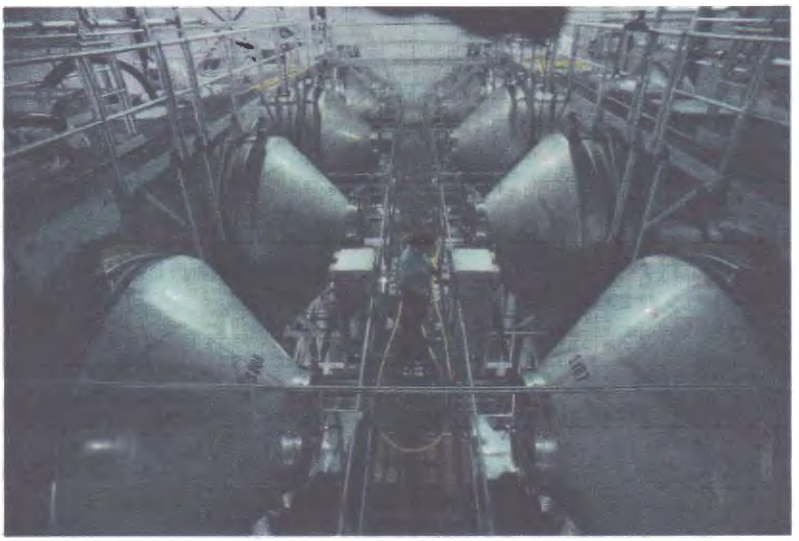


FIGURA 1 Las fermentaciones a escala industrial para producir biocombustible y otros productos se llevan a cabo, normalmente, en tanques que contienen miles de litros de medio.
[Fuente: Charles O'Rear/Corbis].

precipiten las proteínas de la leche produciendo la textura espesa y el sabor amargo del yogur sin azucarar. Otra bacteria, el *Propionibacterium freudenreichii* fermenta la leche produciendo ácido propiónico y CO_2; el ácido propiónico precipita las proteínas de la leche y las burbujas de CO_2 dan lugar a los agujeros característicos del queso suizo. Muchos otros productos son el resultado de fermentaciones: escabeche, chucrut, salsichas, salsa de soja y toda una serie de platos nacionales favoritos tales como el kimchi (Corea), tempoyak (Indonesia), kéfir (Rusia), dahi (India) y pozol (Méjico). El descenso del pH asociado con la fermentación también ayuda a conservar los alimentos, porque la mayoría de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos no pueden crecer a pH bajo. En la agricultura, productos vegetales secundarios tales como los tallos del maíz se conservan para utilizarlos como alimento animal apilándolos en grandes contenedores (silos) con un acceso de aire limitado; la fermentación microbiana produce ácidos que hacen disminuir el pH. El forraje resultante de esta fermentación se puede guardar como pienso durante largos períodos sin que se deteriore.

En 1910 Chaim Weizmann (que después se convirtió en el primer presidente de Israel) descubrió que una bacteria, el *Clostridium acetobutyricum*, fermenta el almidón a butanol y acetona. Este descubrimiento abrió el campo de las fermentaciones industriales, en las que se suministra algún material fácilmente asequible y rico en glúcidos (almidón de maíz o melazas, por ejemplo) a un cultivo puro de un microorganismo específico que lo fermenta dando un producto de mayor valor comercial. El etanol utilizado para fabricar el "gasohol" se produce por fermentación microbiana, al igual que los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico y succínico, y el glicerol, etanol, isopropanol, butanol y butanodiol. Estas fermentaciones se realizan generalmente en grandes recipientes cerrados en los que se ajusta la temperatura y la entrada de aire para favorecer la multiplicación de los microorganismos deseados al tiempo que se excluyen organismos contaminantes. La belleza de las fermentaciones industriales reside en que complicadas transformaciones químicas de muchos pasos se llevan a término con rendimientos elevados y con pocos productos secundarios por fábricas químicas que se reproducen a sí mismas: las células microbianas. En algunas fermentaciones industriales se ha desarrollado tecnología que permite inmovilizar las células sobre un soporte inerte, pasar la materia prima de manera continua a través del lecho de células inmovilizadas y recoger el producto deseado en el efluente: ¡el sueño de un ingeniero!

RESUMEN 14.3 Destinos del piruvato en condiciones anaeróbicas: Fermentación

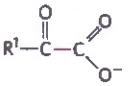
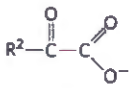
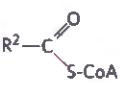
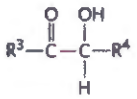
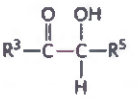
- El NADH formado en la glucólisis debe reciclarse para regenerar el NAD^+ que se requiere como aceptor electrónico en el primer paso de la fase de beneficios. En condiciones aeróbicas los electrones pasan desde el NADH al O_2 en la respiración mitocondrial.
- En condiciones anaeróbicas o hipóxicas muchos organismos regeneran el NAD^+ transfiriendo los electrones del NADH al piruvato y formando lactato. Otros organismos, tales como la levadura, regeneran el NAD^+ mediante reducción del piruvato a etanol y CO_2. En estos procesos anaeróbicos, (fermentaciones), no se produce oxidación o reducción *netas* de los carbonos de la glucosa.
- Una gran variedad de microorganismos pueden fermentar el azúcar de los alimentos frescos, lo que da lugar a cambios de pH, gusto y textura y a la conservación del alimento. Las fermentaciones se utilizan en la industria para producir muchos compuestos orgánicos de valor comercial a partir de materias primas baratas.

14.4 Gluconeogénesis

El papel central de la glucosa apareció tempranamente dentro de la evolución y este azúcar continúa siendo el combustible y bloque estructural casi universal de los organismos modernos, desde los microbios hasta el hombre. En los mamíferos, algunos tejidos dependen casi por completo de la glucosa para la producción de energía metabólica. Para el cerebro y el sistema nervioso humanos, así como para los eritrocitos, testículos, médula renal y tejidos embrionarios la glucosa de la sangre es la única, o principal, fuente de combustible. Solo el cerebro humano requiere más de 120 g de glucosa al día, más de la mitad de toda la glucosa almacenada como glucógeno en el músculo y en el hígado. Sin embargo, el suministro de glucosa a partir de estos depósitos no siempre es suficiente; entre comidas y durante ayunos prolongados, o después de ejercicio vigoroso, el glucógeno se ha agotado. En estos períodos, los organismos necesitan un método para sintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos. Esto se consigue a través de una ruta denominada **gluconeogénesis** ("formación de azúcar nuevo") que convierte el piruvato y compuestos relacionados de tres y cuatro carbonos en glucosa.

La gluconeogénesis tiene lugar en todos los animales, plantas, hongos y microorganismos. Las reacciones son, esencialmente, las mismas en todos los tejidos y en todas las especies. Los precursores importantes de la glucosa en los animales son compuestos de tres carbonos tales como el lactato, piruvato, y el glicerol así como ciertos aminoácidos **(Fig. 14-16)**. En los mamíferos la gluconeogénesis tiene lugar principalmente en el hígado y en menor extensión en la corteza renal y en las células epiteliales que recubren el intestino delgado. La glucosa producida pasa a la sangre para abastecer otros tejidos. Después de un ejercicio vigoroso, el lactato producido por la glucólisis anaeróbica en el músculo esquelético vuelve al hígado y se convierte en glucosa que vuelve de nuevo al músculo y se convierte en glucógeno en un circuito denominado ciclo de Cori (Recuadro 14-2; véase también la Fig. 23-21). En las semillas germinadas de plantas, las grasas y proteínas almacenadas se convierten, a través de rutas entre las que se encuentra la gluconeogénesis, en el disacárido sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo. La glucosa y sus derivados son los precursores en la síntesis de los componentes de las paredes celulares de las plantas, nucleótidos y coenzimas y de un gran número de metabolitos esenciales. En muchos microorganismos la gluconeogénesis empieza a partir de compuestos orgánicos sencillos tales como acetato, lactato y propionato presentes en su medio de cultivo.

TABLA 14-1 Algunas reacciones dependientes de TPP

Enzima	Ruta(s)	Enlace roto	Enlace formado
Piruvato descarboxilasa	Fermentación etanólica		
Piruvato deshidrogenasa α-Cetoglutarato deshidrogenasa	Síntesis de acetil-CoA Ciclo del ácido cítrico		
Transcetolasa	Reacciones de asimilación de carbono Ruta de las pentosas fosfato		

Aunque las reacciones de la gluconeogénesis son las mismas en todos los organismos, el contexto metabólico y la regulación de la vía difieren de un organismo a otro y de tejido a tejido. En esta sección nos fijaremos en la gluconeogénesis tal como tiene lugar en el hígado de los mamíferos. En el Capítulo 20 mostraremos de qué modo utilizan esta vía los organismos fotosintéticos para convertir los productos primarios de la fotosíntesis en glucosa que será almacenada en forma de sacarosa o almidón.

La gluconeogénesis y la glucólisis no son rutas idénticas que transcurren en direcciones opuestas aunque comparten varios pasos **(Fig. 14-17)**; 7 de las 10 reacciones enzimáticas de la gluconeogénesis son la inversa de las reacciones glucolíticas. No obstante, hay tres reacciones de la glucólisis que son prácticamente irreversibles in vivo y que no pueden utilizarse en la gluconeogénesis: la conversión de la glucosa en glucosa 6-fosfato por la hexoquinasa, la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato por la fosfofructoquinasa-1 y la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato por la piruvato quinasa (Fig. 14-17). En las células, estas tres reacciones se caracterizan por una gran variación negativa de energía libre, mientras que otras reacciones glucolíticas tienen una ΔG próxima a 0 (Tabla 14-2). En la gluconeogénesis, los tres pasos irreversibles se "rodean" mediante un conjunto diferente de enzimas que catalizan reacciones que son suficientemente exergónicas para ser efectivamente irreversibles en la dirección de síntesis de la glucosa. De este modo, tanto la glucólisis como la gluconeogénesis son procesos irreversibles en las células. En los animales ambas rutas tienen lugar mayoritariamente en el citosol por lo que necesitan una regulación recíproca y coordinada. La regulación independiente de las dos rutas se consigue a través de controles ejercidos sobre los pasos enzimáticos específicos propios de cada una.

Empezaremos considerando las tres reacciones de rodeo de la gluconeogénesis. (Recuerde que el término "rodeo" ("bypass") hace referencia a los rodeos de las reacciones glucolíticas irreversibles.)

Copy Station

La conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato requiere dos reacciones exergónicas

La primera reacción de rodeo en la gluconeogénesis es la conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato (PEP).

TABLA 14-2 Variaciones de energía libre de reacciones glucolíticas en los eritrocitos

Paso de la reacción glucolítica	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)
❶ Glucosa + ATP ⟶ glucosa 6-fosfato +ADP	−16,7	−33,4
❷ Glucosa 6-fosfato ⇌ fructosa 6-fosfato	1,7	0 a 25
❸ Fructosa 6-fosfato + ATP ⟶ fructosa 1,6-bisfosfato + ADP	−14,2	−22,2
❹ Fructosa 1,6-bisfosfato ⇌ dihidroxiacetona fosfato + gliceraldehído 3-fosfato	23,8	−6 a 0
❺ Dihidroxiacetona fosfato ⇌ gliceraldehído 3-fosfato	7,5	0 a 4
❻ Gliceraldehído 3-fosfato + P_i + NAD^+ ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H^+	6,3	−2 a 2
❼ 1, 3-Bisfosfoglicerato + ADP ⇌ 3-fosfoglicerato + ATP	−18,8	0 a 2
❽ 3-Fosfoglicerato ⇌ 2-fosfoglicerato	4,4	0 a 0,8
❾ 2-Fosfoglicerato ⇌ fosfoenolpiruvato + H_2O	7,5	0 a 3,3
❿ Fosfoenolpiruvato + ADP ⟶ piruvato + ATP	−31,4	−16,7

Nota: $\Delta G'^{\circ}$ es la variación de energía libre estándar tal como se define en el Capítulo 13 (pp. 497-498). ΔG es la variación de energía libre calculada a partir de las concentraciones reales de los intermediarios glucolíticos, presentes en condiciones fisiológicas en los eritrocitos a pH 7. Las reacciones glucolíticas rodeadas en la gluconeogénesis se muestran en rojo. Las reacciones bioquímicas no están necesariamente ajustadas para H o carga.

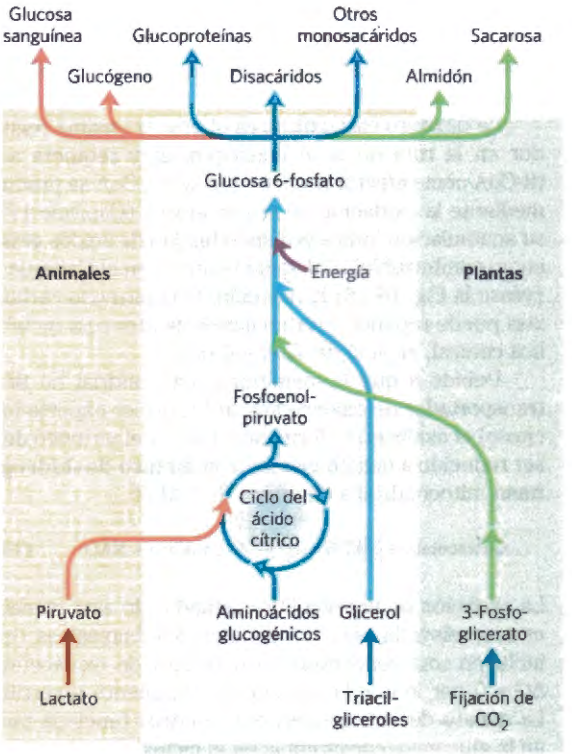


FIGURA 14-16 Síntesis de glúcidos a partir de precursores sencillos. La ruta desde el fosfoenolpiruvato hasta la glucosa 6-fosfato es común en la conversión biosintética de muchos precursores diferentes de glúcidos tanto en animales como en plantas. La ruta desde el piruvato al fosfoenolpiruvato pasa a través del oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico que se discute en el Capítulo 16. Cualquier compuesto que pueda convertirse en piruvato u oxalacetato puede servir, por tanto, como material de partida para la gluconeogénesis. Esto incluye la alanina y el aspartato que se pueden convertir en piruvato y oxalacetato, respectivamente, así como otros aminoácidos que pueden dar lugar a fragmentos con tres o cuatro carbonos, los llamados aminoácidos glucogénicos (véase la Tabla 14-4; véase también la Fig. 18-15). Las plantas y las bacterias fotosintéticas son los únicos organismos capaces de convertir el CO_2 en glúcidos, utilizando el ciclo de Calvin (véase la Sección 20.5).

COPYSTATION

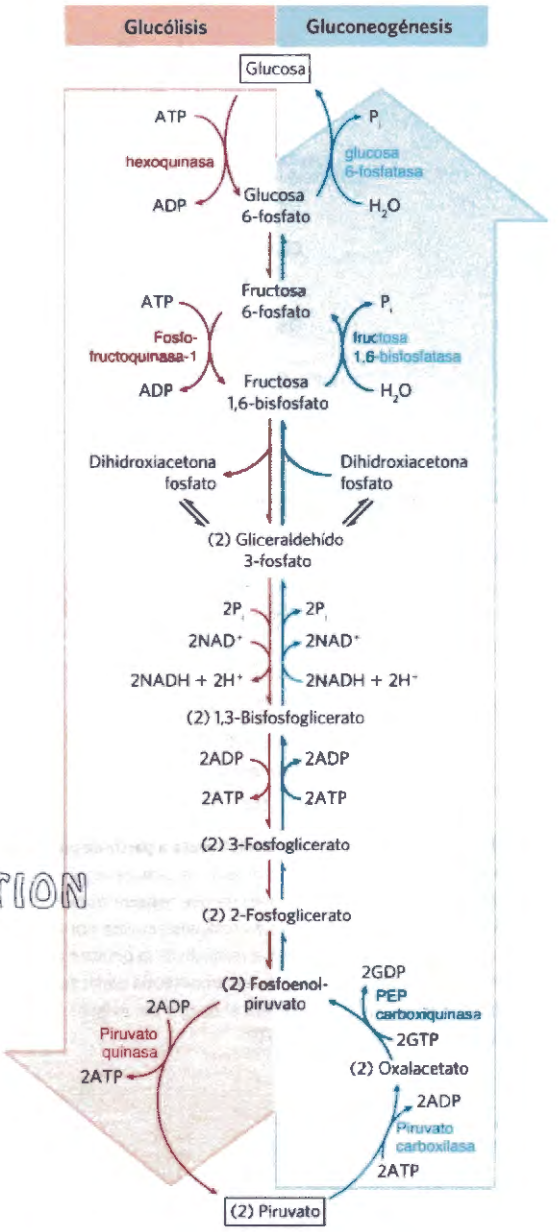


FIGURA 14-17 Rutas opuestas de la glucólisis y de la gluconeogénesis en el hígado de rata. Las reacciones de la glucólisis se muestran en el lado izquierdo en rojo; la ruta opuesta de la gluconeogénesis se muestra a la derecha en azul. Los puntos principales de regulación de la gluconeogénesis que se muestran aquí se discuten posteriormente en este capítulo y, con mayor detalle, en el Capítulo 15. La Figura 14-20 muestra una ruta alternativa para el oxalacetato producido en la mitocondria.

Esta reacción no puede tener lugar por simple inversión de la reacción de la piruvato quinasa que tiene una gran variación negativa de energía libre y que es, por tanto, irreversible en las condiciones existentes en las células intactas (Tabla 14-2, paso ⑩). En su lugar, la fosforilación del piruvato se consigue mediante una secuencia de reacciones de rodeo que, en los eucariotas, requiere enzimas tanto del citosol como de la mitocondria. Tal como veremos, la ruta que se muestra en la Figura 14-17 y que se describe en detalle aquí es una de las dos rutas desde el piruvato al PEP; es la que predomina cuando el precursor glucogénico es el piruvato o la alanina. Una segunda ruta, que se describe más adelante, es la que predomina cuando el precursor glucogénico es el lactato.

En primer lugar se transporta el piruvato desde el citosol a la mitocondria, o se genera dentro de la mitocondria a partir de la alanina por transaminación en la que se transfiere el grupo α-amino de la alanina (que forma piruvato) a un α-cetoácido carboxílico (las reacciones de transaminación se discuten en detalle en el Capítulo 18). A continuación, la **piruvato carboxilasa**, enzima mitocondrial que requiere el coenzima **biotina**, convierte el piruvato en oxalacetato **(Fig. 14-18)**:

$$\text{Piruvato} + HCO_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i \qquad (14\text{-}4)$$

La reacción de carboxilación utiliza biotina como transportador de bicarbonato activado tal como se muestra en la **Figura 14-19**; el mecanismo de reacción se muestra en la Figura 16-17. (Observe que el HCO_3^- se forma por ionización del ácido carbónico producido a partir de

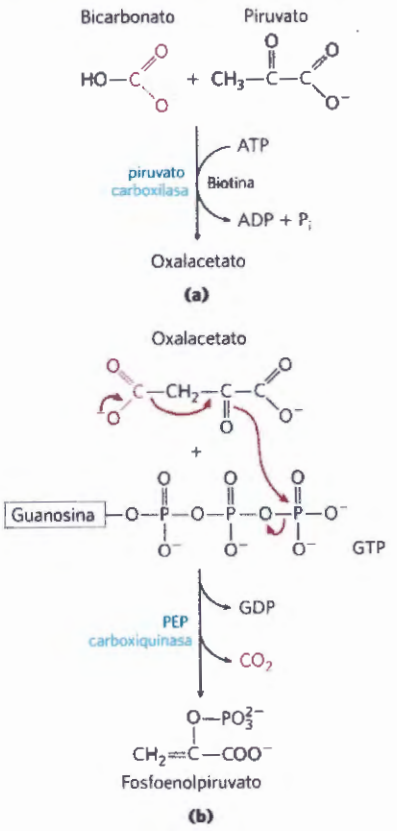


FIGURA 14-18 Síntesis de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato. (a) En la mitocondria, el piruvato se convierte en oxalacetato en una reacción catalizada por la piruvato carboxilasa que requiere biotina. (b) En el citosol, el oxalacetato se convierte en fosfoenolpiruvato por la PEP carboxiquinasa. El CO_2 incorporado en la reacción de la piruvato carboxilasa se pierde aquí en forma de CO_2. La descarboxilación conduce a un reordenamiento de electrones que facilita el ataque del oxígeno carbonílico del piruvato sobre el fosfato γ del GTP.

CO_2 y H_2O). El HCO_3^- se fosforila por acción del ATP formando una anhírido mixto (un carboxifosfato); a continuación la biotina desplaza el fosfato en la formación de la carboxibiotina.

La piruvato carboxilasa es el primer enzima regulador en la ruta de la gluconeogénesis y requiere acetil-CoA como efector positivo. (El acetil-CoA se produce mediante la oxidación de ácidos grasos (Capítulo 17) y su acumulación indica la disponibilidad de ácidos grasos como combustible). Tal como veremos en el Capítulo 16 (véase la Fig. 16-16) la reacción de la piruvato carboxilasa puede reponer intermediarios de otra ruta metabólica central, el ciclo del ácido cítrico.

Debido a que la membrana mitocondrial no tiene transportador de oxalacetato, antes de ser exportado al citosol el oxalacetato formado a partir del piruvato debe ser reducido a malato mediante la **malato deshidrogenasa** mitocondrial a expensas de NADH:

$$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-malato} + \text{NAD}^+ \qquad (14\text{-}5)$$

La variación de energía libre estándar de esta reacción es muy elevada pero, en condiciones fisiológicas (que incluyen una concentración muy baja de oxalacetato) $\Delta G \approx 0$ por lo que la reacción es fácilmente reversible. La malato deshidrogenasa mitocondrial funciona tanto en la gluconeogénesis como en el ciclo del ácido cítrico, aun cuando el flujo global de metabolitos en ambos procesos se da en direcciones opuestas.

El malato abandona la mitocondria vía un transportador específico de la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 13-31) y en el citosol el malato se reoxida a oxalacetato con producción de NADH citosólico:

$$\text{Malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \qquad (14\text{-}6)$$

El oxalacetato se convierte entonces en PEP por la **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa** (Fig. 14-18). Esta reacción dependiente de Mg^{2+} requiere GTP como dador de grupo fosforilo:

$$\text{Oxalacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \qquad (14\text{-}7)$$

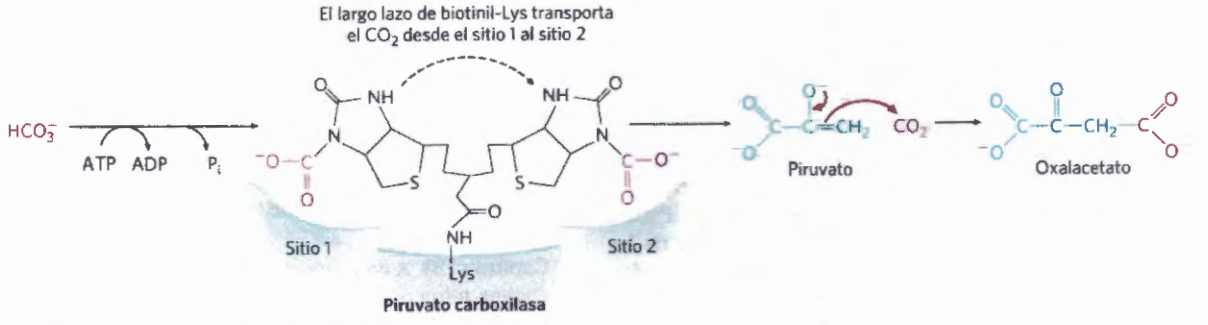


FIGURA 14-19 Papel de la biotina en la reacción de la piruvato carboxilasa. El cofactor biotina está unido de forma covalente al enzima a través de un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo Lys formando un biotinil-enzima. La reacción transcurre en dos fases que tienen lugar en dos sitios diferentes del enzima. En el sitio catalítico 1, el ión bicarbonato se convierte en CO_2 a expensas del ATP. A continuación el CO_2 reacciona con la biotina formando carboxibiotinil-enzima. El largo brazo formado por la biotina y la cadena lateral de la Lys a la que está unida transporta entonces el CO_2 del carboxibiotinil-enzima al sitio catalítico 2 en la superficie enzimática en donde se libera el CO_2 que reacciona con el piruvato dando oxalacetato y regenerando el biotinil-enzima. El papel general de los brazos flexibles en el transporte de intermedios de reacción entre sitios activos del enzima se describe en la Figura 16-18. Mecanismos similares se dan en otras reacciones de carboxilación dependientes de biotina tales como la catalizada por la propionil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 17-12) y la acetil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 21-1).

La reacción es reversible en las condiciones intracelulares; la formación de un compuesto fosfato de alta energía (PEP) se compensa con la hidrólisis de otro (GTP).

La ecuación global para el conjunto de estas reacciones de rodeo, suma de las ecuaciones 14-4 a 14-7, es

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + \text{HCO}_3^- \longrightarrow \text{PEP} + \text{ADP} + \text{GDP} + \text{P}_i + \text{CO}_2 \quad (14\text{-}8)$$
$$\Delta G'^{\circ} = 0{,}9 \text{ kJ/mol}$$

Para fosforilar una molécula de piruvato a PEP se han de gastar dos equivalentes fosfato de alta energía (uno del ATP y otro del GTP), cada uno de los cuales cede 50 kJ/mol en condiciones celulares. Por el contrario, cuando el PEP se convierte en piruvato durante la glucólisis sólo se genera un ATP a partir del ADP. Aunque la variación de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ}$) de la reacción en dos fases desde el piruvato al PEP es de 0,9 kJ/mol, la variación de energía libre real (ΔG), calculada a partir de las concentraciones celulares de intermedios, es muy negativa (-25 kJ/mol); ello es debido al rápido consumo del PEP en otras reacciones de tal modo que su concentración permanece relativamente baja. De este modo la reacción es efectivamente irreversible en la célula.

Observe que el CO_2 incorporado al piruvato en la reacción de la piruvato carboxilasa es la misma molécula que se pierde en la reacción de la PEP carboxiquinasa (Fig. 14-18b). Esta secuencia de carboxilación-descarboxilación representa una forma de "activar" el piruvato de forma que la descarboxilación del oxalacetato facilita la formación de PEP. En el Capítulo 21 veremos que se utiliza una etapa de carboxilación-descarboxilación similar para activar el acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21-1).

Existe una lógica en la ruta de estas reacciones a través de la mitocondria. La razón [NADH]/[NAD$^+$] en el citosol es de 8×10^{-4}, alrededor de 10^5 veces menor que en la mitocondria. Debido a que el NADH citosólico se consume en la gluconeogénesis (en la conversión de 1,3-bisfosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato; Fig. 14-17), la biosíntesis de glucosa no puede tener lugar a menos que se suministre NADH. El transporte del malato desde la mitocondria al citosol y su reconversión allí en oxalacetato representa una forma efectiva de transportar equivalentes de reducción en forma de NADH al citosol, en donde son escasos. Esta ruta desde el piruvato al PEP proporciona, por tanto, un equilibrio importante entre el NADH producido y consumido en el citosol durante la gluconeogénesis.

Cuando el lactato es el precursor glucogénico predomina un segundo rodeo del piruvato a PEP **(Fig. 14-20)**. Esta ruta utiliza el lactato producido por la glucólisis en los eritrocitos o el músculo anaeróbico, por ejemplo, siendo especialmente importante en los vertebrados de mayor tamaño después de un ejercicio vigoroso (Recuadro 14-2). La conversión del lactato en piruvato en el citosol de los hepatocitos produce NADH por lo que la exportación de equivalentes reductores (en forma de malato) desde la mitocondria ya no es necesaria. Una vez transportado el piruvato producido por la reacción de la lactato deshidrogenasa a la mitocondria, se convierte en oxalacetato por la piruvato carboxilasa tal como ya se ha descrito. No obstante, este oxalacetato se convierte directamente en PEP por un isozima mitocondrial de la PEP carboxiquinasa. A continuación se transporta el PEP fuera de la mitocondria para continuar en la ruta gluconeogénica. Los isozimas mitocondrial y citosólico de la PEP carboxiquinasa están codificados por genes diferentes en los cromosomas del nucleo siendo otro ejemplo de dos enzimas distintos que catalizan la misma reacción pero que tienen localizaciones celulares o papeles metabólicos diferentes (recuerde los isozimas de la hexoquinasa).

La conversión de la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato constituye el segundo rodeo

La segunda reacción glucolítica que no puede participar en la gluconeogénesis es la fosforilación de la fructosa 6-fosfato por la PFK-1 (Tabla 14-2, Paso ❸). Debido a que esta reacción es muy exergónica y, por tanto, irreversible en las células intactas, la generación de la fructosa 6-fosfato a partir de la fructosa 1,6-bisfosfato (Fig. 14-17) está catalizada por un enzima diferente, la **fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1),** dependiente de Mg^{2+}, que promueve la *hidrólisis* prácticamente irreversible del fosfato en C-1 (*no* transferencia de grupo fosforilo al ADP):

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{fructosa 6-fosfato} + \text{P}_i$$
$$\Delta G'^{\circ} = -16{,}3 \text{ kJ/mol}$$

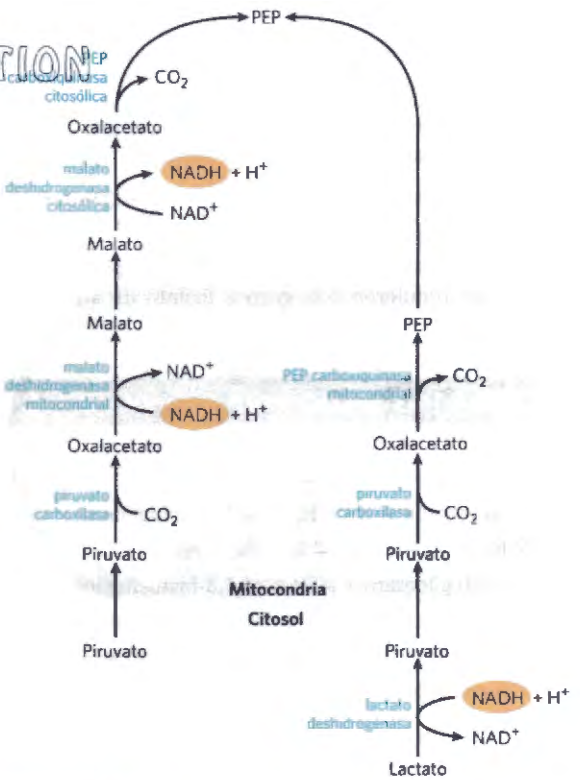


FIGURA 14-20 Rutas alternativas desde el piruvato al fosfoenolpiruvato. La importancia relativa de las dos rutas depende de la disponibilidad de lactato o piruvato y las necesidades citosólicas de NADH para la gluconeogénesis. La ruta de la derecha predomina cuando el precursor es el lactato, debido a que el NADH citosólico se genera en la reacción de la lactato deshidrogenasa y no se ha de transportar fuera de la mitocondria (véase texto).

La FBPasa-1 se denomina así para distinguirla de otro enzima similar (FBPasa-2) con una función reguladora que se discute en el Capítulo 15.

La conversión de la glucosa-6-fosfato en glucosa constituye el tercer rodeo

El tercer rodeo es la reacción final de la gluconeogénesis, la desfosforilación de la glucosa 6-fosfato para dar glucosa (Fig. 14-17). La reacción inversa de la hexoquinasa requeriría la transferencia de un grupo fosforilo desde la glucosa 6-fosfato al ADP para dar ATP, lo que es una reacción energéticamente desfavorable (Tabla 14-2, paso ❶). La reacción catalizada por la **glucosa 6-fosfatasa** no requiere la síntesis de ATP, sino que es una simple hidrólisis de un éster fosfato:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

Este enzima activado por Mg^{2+} se encuentra en la cara de la luz del retículo endoplasmático de los hepatocitos, células renales y epiteliales del intestino delgado (véase la Fig. 15-30), pero no en otros tejidos, que son, por tanto, incapaces de suministrar glucosa a la sangre. Si otros tejidos tuviesen glucosa 6-fosfatasa, la actividad del enzima hidrolizaría la glucosa 6-fosfato que es necesaria en estos tejidos para la glucólisis. La glucosa producida por la gluconeogénesis en el hígado o riñón o ingerida con la dieta se envía a estos otros tejidos, incluido el cerebro y el músculo, a través del torrente circulatorio.

La gluconeogénesis es energéticamente cara, pero es esencial

La suma de las reacciones biosintéticas que llevan del piruvato a la glucosa libre en la sangre (Tabla 14-3) es

$$2 \text{ Piruvato} + 4ATP + 2GTP + 2NADH + 2H^+ + 4H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + 4ADP + 2GDP + 6P_i + 2NAD^+ \quad (14\text{-}9)$$

Por cada molécula de glucosa formada a partir del piruvato, se requieren seis grupos fosfato de alta energía, cuatro del ATP y dos del GTP. Además, se requieren dos moléculas de NADH para la reducción de dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. La ecuación 14-9 no es, claramente, el inverso de la ecuación para la conversión de la glucosa en piruvato por la glucólisis, que sólo requiere dos moléculas de ATP:

$$\text{Glucosa} + 2ADP + 2P_i + NAD^+ \longrightarrow 2 \text{ piruvato} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O$$

La síntesis de glucosa a partir del piruvato es un proceso relativamente costoso. Gran parte del alto costo energético es necesario para asegurar que la gluconeogénesis sea irreversible. En las condiciones intracelulares la variación global de energía libre de la glucólisis es de al menos -63 kJ/mol. En las mismas condiciones la ΔG global de la gluconeogénesis desde el piruvato es -16 kJ/mol. De este modo tanto la glucólisis como la gluconeogénesis son procesos esencialmente irreversibles en las células. Otra ventaja de la inversión en energía para convertir el piruvato en glucosa es que si se tuviese que excretar el piruvato, se perdería su considerable potencial de producción de ATP mediante la oxidación aeróbica completa (tal como veremos en el Capítulo 16 el piruvato produce más de 10 ATP).

Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y muchos aminoácidos son glucogénicos

La ruta biosintética de la glucosa antes descrita permite la síntesis neta de glucosa no sólo desde el piruvato sino también de los intermediarios de cuatro, cinco y seis carbonos del ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). Citrato, isocitrato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato y malato son todos ellos intermediarios del ciclo del ácido cítrico que se pueden oxidar dando oxalacetato (véase la Fig. 16-7). Algunos átomos de carbono, o todos, de la mayoría de aminoácidos procedentes de las proteínas se catabolizan en último término a piruvato o a intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Tales aminoácidos pueden, por tanto, experimentar una conversión neta en glucosa por lo que se denominan

COPY-STATION

TABLA 14-3 Reacciones secuenciales de la gluconeogénesis empezando a partir del piruvato

Piruvato + HCO_3^- + ATP ⟶ oxalacetato + ADP + P_i	X2
Oxalacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP	X2
Fosfoenolpiruvato + H_2O ⇌ 2-fosfoglicerato	X2
2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato	X2
3-Fosfoglicerato + ATP ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + ADP	X2
1,3-Bisfosfoglicerato + NADH + H^+ ⇌ gliceraldehído 3-fosfato + NAD^+ + P_i	X2
Gliceraldehído 3-fosfato ⇌ dihidroxiacetona fosfato	
Gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato ⇌ fructosa 1,6-bisfosfato	
Fructosa 1,6-bisfosfato ⟶ fructosa 6-fosfato P_i	
Fructosa 6-fosfato ⇌ glucosa 6-fosfato	
Glucosa 6-fosfato + H_2O ⟶ glucosa P_i	
Suma: 2 Piruvato + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ ⟶ glucosa + 4ADP + 2GDP + $6P_i$ + $2NAD^+$	

Nota: Las reacciones de rodeo están en rojo; todas las demás reacciones son pasos reversibles de la glucólisis. Las cifras a la derecha indican que la reacción se ha de contar dos veces debido a que se requieren dos precursores de tres carbonos para producir una molécula de glucosa. Las reacciones requeridas para reemplazar el NADH citosólico consumido en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (la conversión de lactato en piruvato en el citosol o el transporte de equivalentes de reducción desde la mitocondria al citosol en forma de malato) no se consideran en este resumen. La ecuaciones bioquímicas no necesariamente están ajustadas para H y carga.

aminoácidos **glucogénicos** (Tabla 14-4). La alanina y la glutamina, principales moléculas transportadoras de grupos amino desde los tejidos extrahepáticos al hígado (véase la Fig. 18-9) son aminoácidos glucogénicos muy importantes en los mamíferos. Después de eliminar sus grupos amino en las mitocondrias hepáticas, los esqueletos carbonados restantes (piruvato y α-cetoglutarato, respectivamente) se canalizan rápidamente hacia la gluconeogénesis.

Los mamíferos no pueden convertir los ácidos grasos en glucosa

No hay conversión neta de los ácidos grasos en glucosa en los mamíferos. Tal como veremos en el Capítulo 17 el catabolismo de la mayoría de ácidos grasos sólo da acetil-CoA. Éste no puede ser utilizado como precursor de la glucosa por los mamíferos porque la reacción de la piruvato deshidrogenasa es irreversible y las células no tienen otra ruta para convertir el acetil-CoA en piruvato. Las plantas, levaduras y muchas bacterias tienen una ruta (el ciclo del glioxilato; véase la Fig. 20-55) para convertir el acetil-CoA en oxalacetato, por lo que estos organismos pueden utilizar ácidos grasos como material de partida para la gluconeogénesis. Esto es de importancia especial, por ejemplo, durante la germinación de las semillas; antes de que se desarrollen las hojas y la fotosíntesis pueda proporcionar energía y glúcidos las semillas utilizan los aceites almacenados en las mismas para la producción de energía y la biosíntesis de las paredes celulares.

Aunque los mamíferos no pueden convertir los ácidos grasos en glúcidos, pueden utilizar la pequeña cantidad de glicerol producido en la degradación de las grasas (triacil*gliceroles*) para la gluconeogénesis. La fosforilación del glicerol por la glicerol quinasa, seguida de la oxidación del carbono central, da dihidroxiacetona fosfato que es un intermediario de la gluconeogénesis en el hígado.

Tal como veremos en el Capítulo 21, el glicerol fosfato es un intermediario esencial en la síntesis de triacilglicerol en los adipocitos, si bien estas células carecen de glicerol quinasa y, por tanto, simplemente no pueden fosforilar el glicerol. En lugar de ello, los adipocitos llevan a cabo una versión truncada de la gluconeogénesis conocida como **gliceroneogénesis**: la conversión del piruvato en dihidroxiacetona fosfato a través de las primeras reacciones de la gluconeogénesis, seguida de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol fosfato (véase la Fig. 21-21).

La glucólisis y la gluconeogénesis están reguladas de forma recíproca

Si se permitiese que la glucólisis (conversión de glucosa en piruvato) y la gluconeogénesis (conversión de piruvato en glucosa) tuvieran lugar simultáneamente a velocidad elevada el resultado sería el consumo de ATP y la producción de calor. Por ejemplo, la PFK-1 y la FBPasa-1 catalizan reacciones opuestas:

$$\text{ATP} + \text{fructosa 6-fosfato} \xrightarrow{\text{PFK-1}} \text{ADP} + \text{fructosa 1,6-bisfosfato}$$

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{FBPasa-1}} \text{fructosa 6-fosfato} + P_i$$

TABLA 14-4 Aminoácidos glucogénicos agrupados según su sitio de entrada

Piruvato	**Succinil-CoA**
Alanina	Isoleucina[a]
Cisteína	Metionina
Glicina	Treonina
Serina	Valina
Treonina	**Fumarato**
Triptófano[a]	Fenilalanina[a]
α-Cetoglutarato	Tirosina[a]
Arginina	**Oxalacetato**
Glutamato	Asparagina
Glutamina	Aspartato
Histidina	
Prolina	

Nota: Todos estos aminoácidos son precursores de glucosa sanguínea o de glucógeno hepático debido a que se pueden convertir en piruvato o intermediarios del ciclo del ácido cítrico. De los 20 aminoácidos comunes sólo leucina y lisina son incapaces de proporcionar carbono para la síntesis neta de glucosa.

[a]Estos aminoácidos también son cetogénicos (véase la Fig. 18-15).

La suma de estas dos reacciones es

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + \text{calor}$$

Estas dos reacciones enzimáticas, y otras varias en las dos rutas, están reguladas alostéricamente y por modificación covalente (fosforilación). En el Capítulo 15 consideraremos los mecanismos de esta regulación detalladamente. Por el momento, es suficiente decir que las rutas están reguladas de manera que cuando aumenta el flujo de glucosa a través de la glucólisis, el flujo de piruvato hacia glucosa disminuye, y viceversa.

RESUMEN 14.4 Gluconeogénesis

- La gluconeogénesis es un proceso ubicuo de múltiples pasos en el que glucosa se produce a partir del lactato, piruvato u oxalacetato, o cualquier compuesto (incluidos los intermediarios del ciclo del ácido cítrico) que se pueden convertir en uno de estos intermediarios. Siete de los pasos de la gluconeogénesis están catalizados por los mismos enzimas utilizados en la glucólisis; son las reacciones reversibles.
- Los tres pasos irreversibles de la ruta glucolítica son rodeados mediante reacciones catalizadas por enzimas gluconeogénicos: (1) conversión del piruvato en PEP a través del oxalacetato, catalizada por la piruvato carboxilasa y la PEP-carboxiquinasa; (2) desfosforilación de la fructosa 1,6-bisfosfato por la FBPasa-1; y (3) desfosforilación de la glucosa 6-fosfato por la glucosa 6-fosfatasa.
- La formación de una molécula de glucosa a partir del piruvato requiere 4 ATP, 2 GTP y 2 NADH; es cara.
- En los mamíferos la gluconeogénesis en el hígado, en el riñón y en el intestino delgado proporciona glucosa para su uso por el cerebro, músculo y eritrocitos.
- La piruvato carboxilasa es estimulada por el acetil-CoA incrementando la velocidad de la gluconeogénesis cuando la célula ya tiene cantidades adecuadas de otros sustratos (ácidos grasos) para la producción de energía.

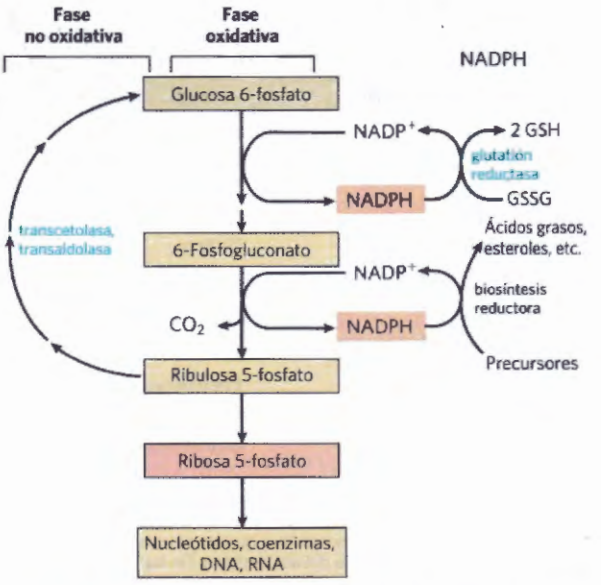


FIGURA 14-21 Esquema general de la ruta de las pentosas fosfato. El NADPH formado en la fase oxidativa es utilizado para reducir el glutatión, GSSG (véase el Recuadro 14-4) y para sostener la biosíntesis reductora. El otro producto de la fase oxidativa es la ribosa 5-fosfato que sirve como precursor de nucleótidos, coenzimas y ácidos nucleicos. En las células que no utilizan ribosa 5-fosfato para la biosíntesis, la fase no oxidativa recicla seis moléculas de la pentosa en cinco moléculas de la hexosa glucosa 6-fosfato lo que permite la producción continua de NADPH y convierte la glucosa 6-fosfato en CO_2 (en seis ciclos).

COPY-STATION

- Los animales no pueden convertir el acetil-CoA obtenido de la de ácidos grasos en glucosa; las plantas y los microorganismos sí pueden.
- La glucólisis y la gluconeogénesis están reguladas recíprocamente para impedir el funcionamiento despilfarrador de ambas rutas al mismo tiempo.

14.5 Ruta de las pentosas fosfato de la oxidación de la glucosa

En la mayoría de tejidos animales el destino catabólico principal de la glucosa 6-fosfato es la degradación glucolítica a piruvato gran parte del cual se oxida vía ciclo del ácido cítrico lo que lleva en último término a la generación de ATP. La glucosa 6-fosfato tiene, sin embargo, otros destinos catabólicos que conducen a productos especializados necesarios para la célula. La oxidación de la glucosa 6-fosfato a pentosas fosfato por la **ruta de las pentosas fosfato** (también llamada **ruta del fosfogluconato**, o **ruta de la hexosa monofosfato; Fig. 14-21**) es un caso de especial importancia en algunos tejidos. En esta ruta oxidativa, el $NADP^+$ es el aceptor electrónico, dando NADPH. Las células en rápida división, tales como las de la médula ósea, piel y mucosa intestinal, así como las de los tumores, utilizan la pentosa ribosa 5-fosfato para producir RNA, DNA y coenzimas tales como el ATP, NADH, $FADH_2$ y coenzima A.

En otros tejidos el producto esencial de la ruta de las pentosas fosfato no son las pentosas sino el dador electrónico NADPH necesario para la biosíntesis reductora o para contrarrestar los efectos perniciosos de los

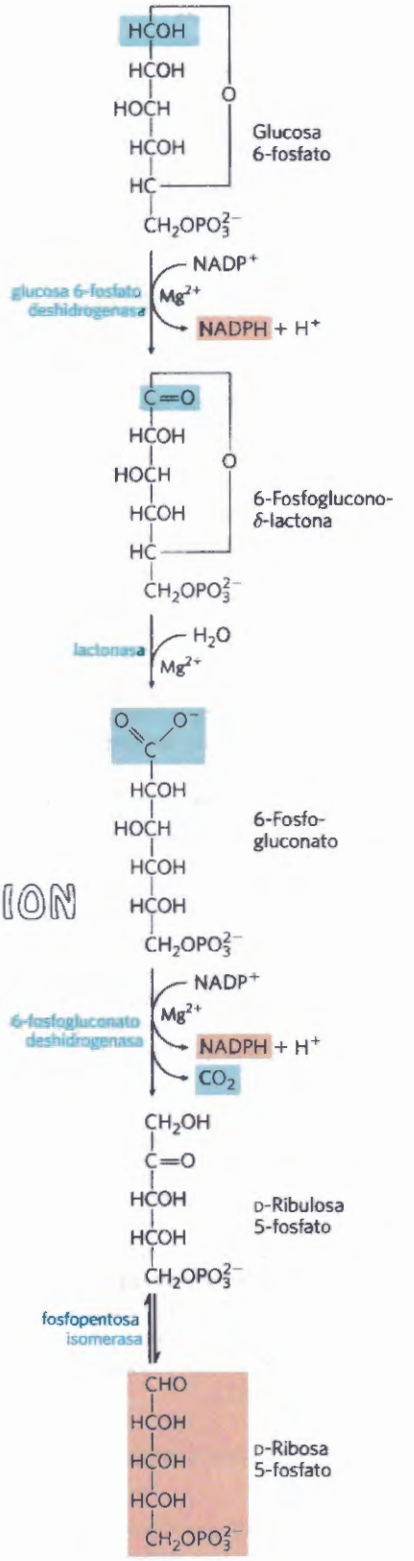


FIGURA 14-22. Reacciones oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato. Los productos finales son la ribosa 5-fosfato, CO_2 y NADPH.

radicales oxigenados. En los tejidos que llevan a cabo una síntesis extensiva de ácidos grasos (hígado, adiposo, glándula mamaria lactante), o la síntesis activa de colesterol y hormonas esteroideas (hígado, glándulas adrenales, gónadas), requieren el NADPH proporcionado por esta ruta. Los eritrocitos y las células del cristalino y de

la córnea están directamente expuestas al oxígeno y, de este modo, a los dañinos radicales libres generados por el oxígeno. Al mantener una atmósfera reductora (una razón NADPH a $NADP^+$ elevada y una razón de glutatión reducido a oxidado alta) pueden prevenir o corregir las lesiones oxidativas sobre las proteínas, lípidos y otras moléculas sensibles. En los eritrocitos, el NADPH producido por la vía de las pentosas fosfato es tan importante en la prevención de las lesiones oxidativas que un defecto genético en la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, el primer enzima de la vía, puede tener consecuencias médicas graves (Recuadro 14-4). ■

La fase oxidativa produce pentosas fosfato y NADPH

La primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato **(Fig. 14-22)** es la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la **glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)**, que forma 6-fosfoglucono-δ-lactona, un éster intramolecular. El $NADP^+$ es el aceptor electrónico y el equilibrio global está muy desplazado en la dirección de formación de NADPH. La lactona se hidroliza dando el ácido libre 6-fosfogluconato por una **lactonasa** específica y en el paso siguiente el 6-fosfogluconato se oxida y descarboxila por la **6-fosfogluconato deshidrogenasa** formando la cetopentosa ribulosa 5-fosfato; la reacción genera una segunda molécula de NADPH. (Esta ribulosa 5-fosfato es importante en la regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis tal como veremos en el Capítulo 15). La **fosfopentosa isomerasa** convierte la ribulosa 5-fosfato en su isómero aldosa, la ribosa 5-fosfato. En algunos tejidos la ruta de las pentosas fosfato acaba en este punto siendo su ecuación global:

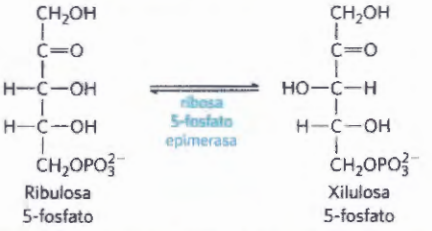
COPY-STATION

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + 2NADP^+ + H_2O \longrightarrow \text{ribosa 5-fosfato} + CO_2 + 2NADPH + 2H^+$$

El resultado neto es la producción de NADPH, un reductor para las reacciones biosintéticas y ribosa 5-fosfato, precursor de la síntesis de nucleótidos.

La fase no oxidativa recicla las pentosas fosfato a glucosa 6-fosfato

En los tejidos en los que se requiere principalmente NADPH, las pentosas fosfato producidas en la fase oxidativa de la ruta se reciclan a glucosa 6-fosfato. En esta fase no oxidativa la ribulosa 5-fosfato se epimeriza en primer lugar a xilulosa 5-fosfato:



A continuación, en una serie de reordenamientos de los esqueletos carbonados **(Fig. 14-23)** seis azúcares fosfato de cinco carbonos se convierten en cinco azúcares fosfato de seis carbonos completando el ciclo y permitiendo la oxidación continua de glucosa 6-fosfato con producción de NADPH. El reciclado continuo conduce en último término a la conversión de glucosa 6-fosfato en seis CO_2. Dos enzimas únicos de la ruta de las pentosas fosfato actúan en estas interconversiones de azúcares: la transcetolasa y la transaldolasa. La **transcetolasa**, cataliza la transferencia de un fragmento de dos carbonos desde un dador cetosa a un aceptor aldosa **(Fig. 14-24a)**. En su primera aparición en la ruta de las pentosas fosfato, la transcetolasa transfiere C-1 y C-2 de la xilulosa 5-fosfato a la ribosa 5-fosfato formando el producto de siete carbonos sedoheptulosa 7-fosfato (Fig. 14-24b). El fragmento de tres carbonos restante de la xilulosa es el gliceraldehído 3-fosfato.

A continuación, la **transaldolasa** cataliza una reacción similar a la reacción de la aldolasa en la glucólisis: se elimina un fragmento de tres carbonos de la sedoheptulosa 7-fosfato y se condensa con gliceraldehído 3-fosfato, formando fructosa 6-fosfato y la tetrosa eritrosa

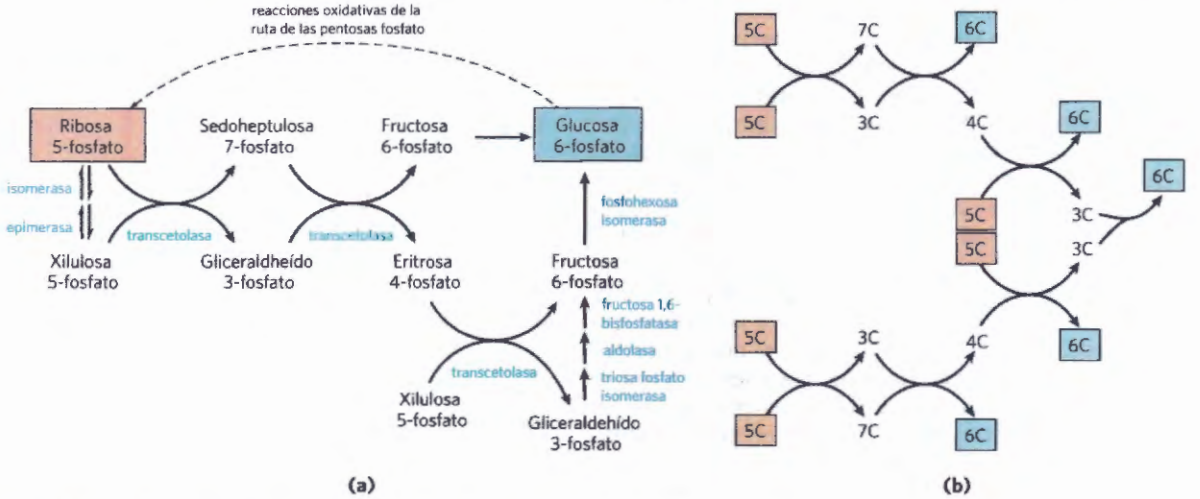


FIGURA 14-23 Reacciones no oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato. (a) Estas reacciones convierten pentosas fosfato en hexosas fosfato, lo que permite que continúen las reacciones oxidativas (véase la Fig. 14-22). La transcetolasa y la transaldolasa son específicos de esta ruta; los otros enzimas también actúan en las rutas glucolítica o gluconeogénica. **(b)** Diagrama esquemático que muestra la ruta de seis pentosas (5C) a cinco hexosas (6C). Observe que intervienen dos juegos de las interconversiones mostradas en **(a)**. Cada reacción mostrada aquí es reversible; las flechas unidireccionales se utilizan sólo para clarificar la dirección de las reacciones durante la oxidación continua de la glucosa 6-fosfato. En las reacciones independientes de la luz en la fotosíntesis, la dirección de estas reacciones está invertida (véase la Fig. 20-37).

RECUADRO 14-4 MEDICINA ¿Por qué Pitágoras no comía falafel?: Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Las habas, un ingrediente del falafel, han sido una fuente importante de alimentación en el Mediterráneo y en el Oriente Medio desde la antigüedad. El matemático y filósofo griego Pitágoras prohibió comer habas a sus seguidores quizás debido a que hacían que mucha gente sufriese la enfermedad llamada favismo, que podía ser fatal. En el favismo, los eritrocitos empiezan a lisarse al cabo de unas 24 a 48 horas de haber comido las habas, liberando hemoglobina en la sangre. Como resultado, se produce ictericia e incluso a veces fallo renal. Pueden observarse síntomas similares tras la ingestión del medicamento antimalárico primaquina, sulfamidas o tras la exposición a ciertos herbicidas. Estos síntomas tienen una base genética: la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) que afecta a unos 400 millones de personas en todo el mundo. La mayor parte de los individuos con déficit de G6PD son asintomáticos: sólo la combinación de la deficiencia de G6PD con ciertos factores medioambientales producen los síntomas clínicos.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cataliza el primer paso de la ruta de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14-22), que produce NADPH. Este reductor, esencial para muchas rutas biosintéticas, protege también a las células de las lesiones oxidativas por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por radicales libres superóxido que son oxidantes muy reactivos generados como subproductos metabólicos y por la acción de fármacos tales como la primaquina y de productos naturales tales como la divicina (el ingrediente tóxico de las habas). Durante la destoxificación normal el H_2O_2 se convierte en H_2O gracias a la acción del glutatión reducido y de la glutatión peroxidasa. El glutatión oxidado se vuelve a convertir a la forma reducida por la acción de la glutatión reductasa y NADPH (Fig. 1). El H_2O_2 se puede transformar, también, en H_2O y O_2 por la acción de la catalasa, que también requiere NADPH. En los individuos deficientes de G6PD, la producción de NADPH está muy disminuida y, por tanto, la destoxificación del H_2O_2 está inhibida. El daño celular resultante consiste en la peroxidación de lípidos que conducen a la rotura de la membrana eritrocitaria y en la oxidación de proteínas y DNA.

La distribución geográfica de la deficiencia de G6PD es muy indicativa. En el África tropical, zonas de Oriente Medio y Sudeste asiático las frecuencias pueden llegar al 25 %. Éstas son, al mismo tiempo, zonas donde la malaria tiene una gran prevalencia. Además de tales observaciones epidemiológicas, los estudios in vitro demuestran que el crecimiento de un parásito de la malaria, el *Plasmodium falciparum*, está inhibido en los eritrocitos con déficit de G6PD. El parásito es muy sensible al daño oxidativo y muere con un nivel de estrés oxidativo que es tolerable para el huésped humano con déficit de G6PD. Debido a la ventaja que proporciona esta resistencia a la malaria se compensa la desventaja de una menor resistencia al daño oxidativo. La selección natural mantiene el genotipo G6PD-deficiente en las poblaciones humanas donde la malaria es frecuente. Sólo bajo un gran estrés oxidativo, provocado por drogas, herbicidas o divicina, la deficiencia en G6PD provoca graves problemas médicos.

Se cree que un medicamento contra la malaria tal como la primaquina actúa provocando estrés oxidativo al parásito. Resulta irónico que los fármacos contra la malaria puedan provocar una enfermedad utilizando el mismo mecanismo bioquímico que confiere resistencia a la malaria. La divicina también actúa como un fármaco antimalaria por lo que la ingestión de habas puede proteger contra la misma. Por lo tanto, muchos discípulos de Pitágoras con actividad normal de la G6PD aumentaron de manera inconsciente el riesgo de contraer malaria ¡al no querer comer falafel!

GOZY-STATION

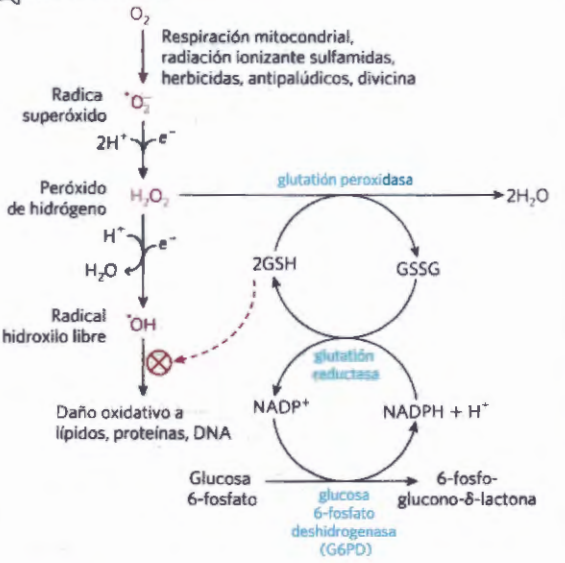


FIGURA 1 Papel del NADPH y del glutatión en la protección de las células frente a derivados de oxígeno altamente reactivos. El glutatión reducido (GSH) protege a las células destruyendo el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo libres. La regeneración del GSH a partir de su forma oxidada (GSSG) necesita NADPH producido por la reacción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

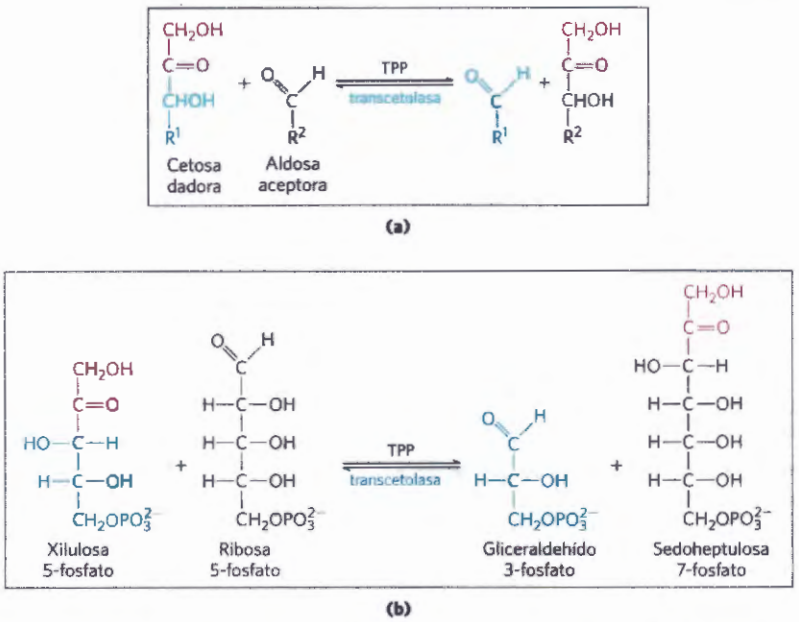


FIGURA 14-24 Primera reacción catalizada por la transcetolasa. **(a)** La reacción general catalizada por la transcetolasa es la transferencia de un grupo de dos carbonos, transportado de forma temporal sobre TPP ligado al enzima, desde un dador cetosa a un aceptor aldosa. **(b)** Conversión de dos pentosas fosfato en una triosa fosfato y un azúcar fosfato de siete carbonos, la sedoheptulosa 7-fosfato.

4-fosfato **(Fig. 14-25)**. Ahora la transcetolasa vuelve a actuar formando fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato a partir de la eritrosa 4-fosfato y la xilulosa 5-fosfato **(Fig. 14-26)**. Dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato formado por dos repeticiones de estas reacciones pueden convertirse en una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato como en la gluconeogénesis (Fig. 14-17) y, finalmente, la FBPasa-1 y la fosfohexosa isomerasa convierten la fructosa 1,6-bisfosfato en glucosa 6-fosfato. El ciclo está ahora completo: ¡en conjunto seis pentosas fosfato se han convertido en cinco hexosas fosfato (Fig. 14-23b)

La transcetolasa requiere el cofactor tiamina pirofosfato (TPP), que estabiliza un carbanión de dos carbonos en esta reacción **(Fig. 14-27a)** de la misma forma que lo hace en la reacción de la piruvato descarboxilasa (Fig. 14-15). La transaldolasa utiliza la cadena lateral de una Lys para formar una base de Schiff con el grupo carbonilo de su sustrato, una cetosa, estabilizando así un carbanión (Fig. 14-27b) crucial en el mecanismo de reacción.

El proceso descrito en la Figura 14-22 se conoce como **ruta oxidativa de las pentosas fosfato.** El primer y tercer pasos son oxidaciones con variaciones de energía libre estándar grandes y negativas y son prácticamente irreversibles en la célula. Las reacciones de la parte no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 14-23) son fácilmente reversibles, con lo que

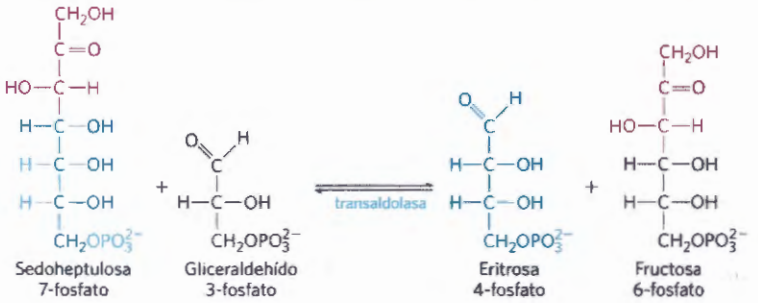


FIGURA 14-25 Reacción catalizada por la transaldolasa.

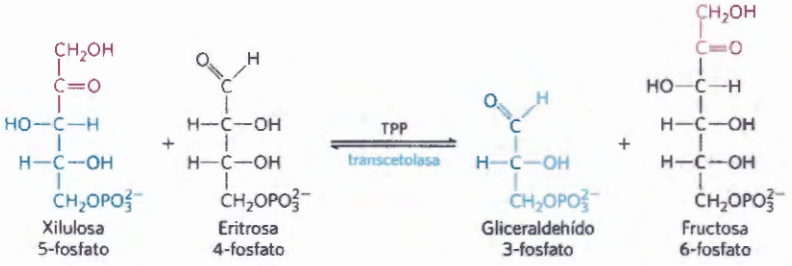


FIGURA 14-26 Segunda reacción catalizada por la transcetolasa.

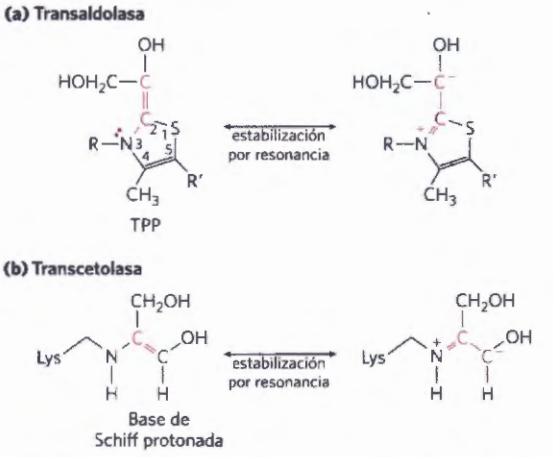


FIGURA 14-27 Intermedios carbanión estabilizados por interacciones covalentes con la transcetolasa y la transaldolasa. **(a)** El anillo del TPP estabiliza el carbanión en el grupo dihidroxietilo transportado por la transcetolasa; véase la Fig. 14-15 para la química de la acción del TPP. **(b)** En la reacción de la transaldolasa, la base de Schiff protonada formada entre el grupo ε-amino de la cadena lateral de una Lys y el sustrato estabiliza un carbanión en C-3 formado después de la rotura aldólica.

proporcionan de este modo un medio para convertir hexosas fosfato en pentosas fosfato. Tal como veremos en el Capítulo 20, un proceso que convierte hexosas fosfato en pentosas fosfato es esencial en la asimilación fotosintética del CO_2 por las plantas. Esta ruta, la **ruta reductora de las pentosas fosfato,** es básicamente el inverso de las reacciones mostradas en la Figura 14-23 y emplea muchos de los mismos enzimas.

Todos los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato están localizados en el citosol, al igual que los de la glucólisis y la mayoría de los de la gluconeogénesis. De hecho, estas tres rutas están conectadas a través de varios intermediarios y enzimas compartidos. El gliceraldehído 3-fosfato formado por la acción de la transcetolasa se convierte rápidamente en dihidroxiacetona fosfato por el enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa y estas dos triosas se pueden unir por la acción de la aldolasa al igual que en la gluconeogénesis, formando fructosa 1,6-bisfosfato. De modo alternativo, las triosas fosfato pueden oxidarse a piruvato por las reacciones glucolíticas. El destino de las triosas viene determinado por las necesidades relativas de la célula respecto a pentosas fosfato, NADPH y ATP.

Un defecto en la transcetolasa agrava el síndrome de Wernicke-Korsakoff

El síndrome de Wernicke-Korsakoff, es una enfermedad causada por una carencia grave de tiamina, un componente del TPP. El síndrome es más frecuente en los alcohólicos que en la población general; el consumo crónico del alcohol en grandes cantidades interfiere con la absorción intestinal de la tiamina. El síndrome puede agravarse por una mutación en el gen de la transcetolasa que produce un enzima con una afinidad disminuida hacia el TPP que es una décima parte de la del enzima normal. Este defecto hace que los individuos sean mucho más sensibles a la carencia de tiamina: incluso una deficiencia moderada de la tiamina (tolerable en individuos con una trancetolasa sin mutar) puede disminuir el nivel de TPP por debajo del necesario para saturar el enzima. El resultado es una disminución de la velocidad de la ruta completa de las pentosas fosfato. En las personas con el síndrome de Wernicke-Korsakoff esto produce un empeoramiento de los síntomas, que pueden incluir grave pérdida de memoria, confusión mental y parálisis parcial. ■

La glucosa 6-fosfato se reparte entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato

El que la glucosa 6-fosfato entre en la glucólisis o en la ruta de las pentosas fosfato depende de las necesidades momentáneas de la célula y de la concentración de $NADP^+$ en el citosol. Sin este aceptor electrónico, no puede producirse la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato (catalizada por la G6PD). Cuando una célula está convirtiendo rápidamente NADPH en $NADP^+$ en reducciones biosintéticas, aumenta el nivel de $NADP^+$ lo que estimula alostéricamente la G6PD incrementando de este modo el flujo de glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato **(Fig. 14-28)**. Cuando disminuye la demanda de NADPH, disminuye el nivel de $NADP^+$, la ruta de las pentosas fosfato se hace más lenta y, en su lugar, la glucosa 6-fosfato se utiliza como combustible para la glucólisis.

RESUMEN 14.5 Ruta de las pentosas fosfato de oxidación de la glucosa

■ La ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato (ruta del fosfogluconato o ruta de la hexosa monofosfato) da lugar a la oxidación y la descarboxilación de la glucosa 6-fosfato en la posición C-1, reduciendo el $NADP^+$ a NADPH y formando pentosas fosfato.

■ El NADPH proporciona poder reductor para las reacciones biosintéticas y la ribosa 5-fosfato es un precursor para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Los tejidos en rápido crecimiento y los tejidos con una biosíntesis activa de ácidos grasos, colesterol u hormonas esteroideas envían más glucosa 6-fosfato a través de

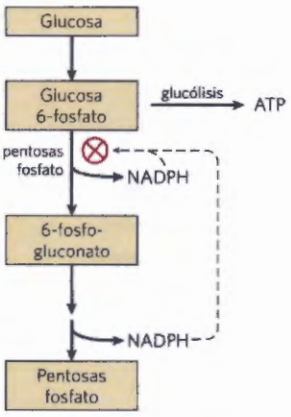


FIGURA 14-28 Papel del NADPH en la regulación del reparto de la glucosa 6-fosfato entre glucólisis y ruta de las pentosas fosfato. Cuando se forma NADPH más rápidamente de lo que se utiliza para la biosíntesis y reducción del glutatión (véase la Fig. 14-21), aumenta la [NADPH] con lo que inhibe el primer enzima de la ruta de las pentosas fosfato. El resultado es que hay más glucosa 6-fosfato disponible para la glucólisis.

la ruta de las pentosas fosfato que los tejidos con menos demanda de pentosas fosfato y de poder reductor.

- La primera fase de la ruta de las pentosas fosfato consiste en dos oxidaciones que convierten la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato y reducen el $NADP^+$ a NADPH. La segunda fase comprende pasos no oxidativos que convierten pentosas fosfato en glucosa 6-fosfato, la cual empieza de nuevo el ciclo.
- En la segunda fase, la transcetolasa (con TPP como cofactor) y la transaldolasa catalizan la interconversión de azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos, con la conversión reversible de seis pentosas fosfato en cinco hexosas fosfato. En las reacciones asimiladoras de carbono de la fotosíntesis, los mismos enzimas catalizan el proceso inverso, denominado ruta *reductora* de las pentosas fosfato: la conversión de cinco hexosas fosfato en seis pentosas fosfato.
- Un defecto genético de la transcetolasa que disminuye su afinidad hacia el TPP agrava el síndrome de Wernicke-Korsakoff.
- La entrada de la glucosa 6-fosfato en la glucólisis o en la ruta de las pentosas fosfato está determinada mayoritariamente por las concentraciones relativas de $NADP^+$ y NADPH.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

glucólisis 534
fermentación 534
fermentación del ácido láctico 537
hipoxia 537
fermentación etanólica (alcohólica) 537
isozimas 538
acil fosfato 540
fosforilación a nivel de sustrato 543
fosforilación ligada a la respiración 543
fosfoenolpiruvato (PEP) 544
glucólisis aeróbica 545
mutasas 550
isomerasas 550
intolerancia a la lactosa 550
galactosemia 552
tiamina pirofosfato (TPP) 555
gluconeogénesis 557
biotina 559
ruta de las pentosas fosfato 564
ruta del fosfogluconato 564
ruta de la hexosa monofosfato 564

COPYSTATION

Problemas

1. Ecuación de la fase preparatoria de la glucólisis Escriba ecuaciones bioquímicas igualadas de todas las reacciones del catabolismo de la glucosa a dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (fase preparatoria de la glucólisis) incluyendo la variación de energía libre estándar de cada ecuación. A continuación escriba la ecuación global o neta de la fase preparatoria de la glucólisis con la variación neta de energía libre estándar.

2. Fase de beneficios de la glucólisis en el músculo esquelético En el músculo esquelético activo en condiciones anaeróbicas, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en piruvato (fase de beneficios de la glucólisis) y el piruvato se reduce a lactato. Escriba ecuaciones bioquímicas igualadas de todas las reacciones de este proceso junto con la variación de energía libre estándar de cada una de ellas. A continuación escriba la ecuación global o neta de la fase de beneficios de la glucólisis (con el lactato como producto final) incluyendo la variación neta de energía libre estándar.

3. Transportadores GLUT Compare la localización de GLUT4 con las de GLUT2 y GLUT3 y explique por qué estas localizaciones son importantes en la respuesta del músculo, tejido adiposo, cerebro e hígado a la insulina.

4. Producción de etanol en la levadura Cuando crece anaeróbicamente sobre glucosa, la levadura (*S. cerevisiae*) convierte el piruvato en acetaldehído y a continuación reduce el acetaldehído a etanol utilizando electrones del NADH. Escriba la ecuación de la segunda reacción y calcule su constante de equilibrio a 25 °C, dados los potenciales de reducción estándar de la Tabla 13-7.

5. Energética de la reacción de la aldolasa La aldolasa cataliza la reacción glucolítica

Fructosa 1,6-bisfosfato ⟶
gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato

La variación de energía libre estándar de esta reacción en la dirección escrita es +23,8 kJ/mol. La concentración de los tres intermediarios en el hepatocito de un mamífero son: fructosa 1,6-bisfosfato, 1,4 x 10^{-5} M; gliceraldehído 3-fosfato, 3 x 10^{-6} M y dihidroxiacetona fosfato, 1,6 x 10^{-5} M. A temperatura corporal (37 °C) ¿cuál es la variación real de energía libre de la reacción?

6. Ruta de los átomo en la fermentación Se lleva a cabo un experimento de "pulso y persecución" en un extracto de levadura utilizando fuentes de carbono marcadas con ^{14}C en condiciones estrictamente anaeróbicas para producir etanol. El experimento consiste en incubar una pequeña cantidad de sustrato marcado con ^{14}C (el pulso) con el extracto de levadura sólo el tiempo justo para que cada intermediario de la ruta fermentativa quede marcado. Se "persigue" a continuación la marca a través de la ruta mediante la adición de un exceso de glucosa sin marcar. La persecución impide efectivamente la entrada de más glucosa marcada en la ruta.

(a) Si se utiliza [1-^{14}C]glucosa (glucosa marcada en el C-1 con ^{14}C) como sustrato, ¿cuál es la localización del ^{14}C en el producto etanol? Explíquelo.

(b) ¿En qué parte de la glucosa tendría que estar localizado el ^{14}C de la molécula inicial de glucosa para asegurar que toda la actividad ^{14}C se libera en forma de $^{14}CO_2$ durante la fermentación a etanol? Explíquelo.

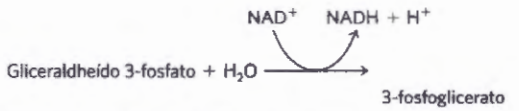
7. Calor a partir de las fermentaciones Los fermentadores industriales a gran escala requieren, generalmente, un enfriamiento vigoroso. ¿Por qué?

8. Fermentación para producir salsa de soja La salsa de soja se prepara fermentando una mezcla salada de semillas de soja y trigo junto con varios microorganismos, entre ellos la levadura, durante un período de 8 a 12 meses. La salsa resultante (después de eliminar los sólidos) es rica en lactato y etanol. ¿Cómo se forman estos dos productos? Es necesario eliminar el oxígeno del tanque de fermentación para que la salsa de soja no tenga un fuerte sabor a vinagre (el vinagre es ácido acético diluido). ¿Por qué?

9. Equivalencia de las triosas fosfato A un extracto de levadura se añadió gliceraldehído 3-fosfato marcado con ^{14}C. Después de un corto período de tiempo, se aisló fructosa 1,6-bisfosfato marcada con ^{14}C en C-3 y C-4. ¿Dónde se localizaba el ^{14}C en el gliceraldheído 3-fosfato inicial? ¿De dónde procede el segundo ^{14}C que se encuentra en la fructosa 1,6-bisfosfato? Explíquelo.

10. Cortocircuito de la glucólisis Suponga que descubre una levadura mutante cuya ruta glucolítica es más corta de-

bido a la presencia de un nuevo enzima que cataliza la reacción:



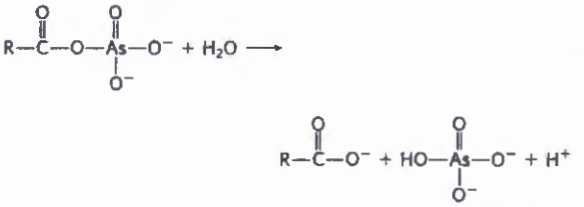
¿Sería un beneficio para la célula este acortamiento en la ruta glucolítica? Explíquelo.

11. Función de la lactato deshidrogenasa Durante la actividad vigorosa la demanda de ATP en el tejido muscular aumenta muchísimo. En el músculo de la pata de conejo o en el del ala de pavo, el ATP se produce de manera casi exclusiva por fermentación láctica. El ATP se produce en la fase de beneficios de la glucólisis mediante dos reacciones, catalizadas por la fosfoglicerato quinasa y por la piruvato quinasa. Suponga que el músculo esquelético no tuviese lactato deshidrogenasa. ¿Podría llevar a cabo una actividad física intensa? O lo que es lo mismo, ¿podría la glucólisis generar ATP a gran velocidad? Explíquelo.

12. Eficiencia de la producción de ATP en el músculo La transformación de glucosa en lactato en los miocitos, sólo desprende un 7 % de la energía libre producida cuando la glucosa se oxida completamente a CO_2 y H_2O. ¿Significa esto que la glucólisis anaeróbica del músculo representa un despilfarro de glucosa? Explíquelo.

13. Variación de energía libre en la oxidación de las triosas fosfato La oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, transcurre con una constante de equilibrio desfavorable (K'eq = 0,08; $\Delta G'^{\circ}$ = 6,3 kJ/mol) y, sin embargo, el flujo a través de este punto de la ruta glucolítica transcurre suavemente. ¿Cómo supera la célula este equilibrio desfavorable?

14. Envenenamiento por arseniato El arseniato es química y estructuralmente similar al fosfato inorgánico (P_i) habiendo muchos enzimas que requieren fosfato y que también utilizan el arseniato. No obstante, los compuestos orgánicos de arseniato son menos estables que los compuestos análogos de fosfato. Por ejemplo, los acil *arseniatos* se descomponen rápidamente por hidrólisis:



Por otro lado, los acil *fosfatos*, tales como el 1,3-bisfosfoglicerato, son más estables transformándose en las células por acción enzimática.

(a) Pronostique el efecto sobre la reacción neta catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa si se reemplazara el fosfato por arseniato.

(b) ¿Cuál sería la consecuencia para un organismo si se sustituyese el fosfato por arseniato? El arseniato es muy tóxico para la mayoría de organismos. Explíquelo.

15. Necesidad de fosfato en la fermentación alcohólica En 1906 Harden y Young realizaron una serie de estudios clásicos sobre la fermentación de la glucosa a etanol y CO_2 por extractos de levadura de cerveza e hicieron las siguientes observaciones. (1) El fosfato inorgánico era esencial para la fermentación; cuando se agotaba el suministro de fosfato cesaba la fermentación antes de que se utilizase toda la glucosa. (2) Durante la fermentación en estas condiciones, se acumulaban etanol, CO_2 y una hexosa bisfosfato. (3) Cuando se sustituía el fosfato por arseniato, no se acumulaba la hexosa bisfosfato pero transcurría la fermentación hasta que toda la glucosa se convertía en etanol y CO_2.

(a) ¿Por qué cesa la fermentación cuando se agota el suministro de fosfato?

(b) ¿Por qué se acumulan etanol y CO_2? ¿Es esencial la conversión del piruvato en etanol y CO_2? ¿Por qué? Identifique la hexosa bisfosfato que se acumula. ¿Por qué se acumula?

(c) ¿Por qué la sustitución del fosfato por arseniato impide la acumulación de la hexosa bisfosfato permitiendo, no obstante, que la fermentación a etanol y CO_2 sea completa? (Véase el problema 14)

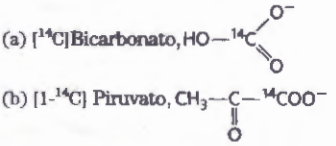
16. Papel de la vitamina niacina (nicotinamida). Un adulto durante una actividad física intensa necesita un aporte de unos 160 g de glúcidos diarios y de sólo unos 20 mg de niacina para una nutrición óptima. Conociendo el papel de la niacina en la glucólisis, ¿cómo se explicaría esta observación?

17. Síntesis de glicerol fosfato El glicerol 3-fosfato necesario para la síntesis de glicerofosfolípidos puede sintetizarse a partir de un intermediario glucolítico. Proponga una secuencia de reacciones para esta conversión.

18. Gravedad de los síntomas clínicos debidos a deficiencias enzimáticas Los síntomas clínicos de dos formas de galactosemia (déficit de galactoquinasa o de UDP-glucosa:galactosa 1-fosfato uridililtransferasa), muestran una gravedad radicalmente diferente. Aunque ambos tipos provocan molestias gástricas después de la ingestión de leche, la deficiencia de la transferasa también conduce a disfunción hepática, renal, del bazo y cerebral y finalmente a la muerte. ¿Qué productos se acumulan en la sangre y tejidos en cada déficit enzimático? Calcule las toxicidades relativas de estos productos a partir de la información precedente.

19. Pérdida de masa muscular en la inanición Una consecuencia de la inanición es la reducción de la masa muscular. ¿Qué les sucede a las proteínas musculares?

20. Ruta de los átomos en la gluconeogénesis Un extracto hepático que puede llevar a cabo todas las reacciones metabólicas normales del hígado se incuba brevemente en experimentos separados con los siguientes precursores marcados con ^{14}C:



Trace la ruta de cada precursor a través de la gluconeogénesis. Indique la localización del ^{14}C en todos los intermediarios del proceso y en el producto glucosa.

21. Coste energético de un ciclo de glucólisis y gluconeogénesis ¿Cuál es el coste (en equivalentes de ATP) de transformar glucosa en piruvato a través de la glucólisis, y de nuevo piruvato en glucosa a través de la gluconeogénesis?

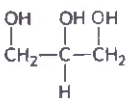
22. Relación entre gluconeogénesis y glucólisis ¿Por qué es importante que la gluconeogénesis no sea el inverso exacto de la glucólisis?

23. Energética de la reacción de la piruvato quinasa Explique en términos bioenergéticos de qué modo la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato durante la gluconeogénesis supera la gran variación negativa de energía libre estándar de la reacción de la piruvato quinasa de la glucólisis.

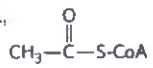
24. Sustratos glucogénicos Un procedimiento común para determinar la efectividad de compuestos como precursores de glucosa en mamíferos es hace ayunar al animal hasta que se han agotado los depósitos hepáticos de glucógeno y administrando seguidamente la sustancia en cuestión. Un sustrato que lleva a un incremento *neto* del glucógeno hepático se denomina glucogénico porque debe convertirse primeramente en glucosa 6-fosfato. Muestre mediante reacciones enzimáticas conocidas cuáles de las siguientes sustancias son glucogénicas:

(a) Succinato, $^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^{-}$

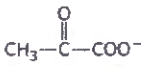
(b) Glicerol,



(c) Acetil-CoA,



(d) Piruvato,



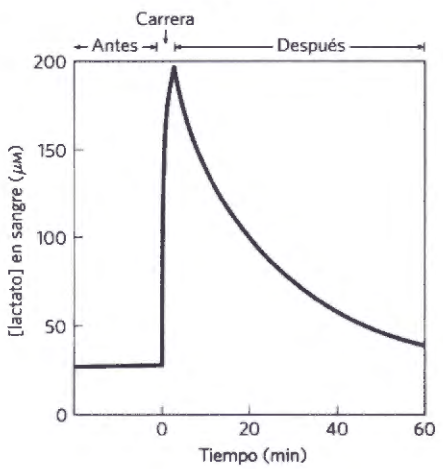
(e) Butirato, $CH_3-CH_2-CH_2-COO^{-}$

25. El etanol afecta los niveles de glucosa en sangre El consumo de alcohol (etanol), especialmente después de períodos de actividad vigorosa o después de no comer durante varias horas, produce una deficiencia de glucosa en sangre, lo que es conocido como hipoglucemia. El primer paso en el metabolismo del etanol en el hígado es la oxidación a acetaldehído, que está catalizada por la alcohol deshidrogenasa hepática:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \longrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Explica de qué modo esta reacción inhibe la transformación de lactato en piruvato. ¿Por qué esto produce hipoglucemia?

26. Niveles sanguíneos de lactato durante el ejercicio vigoroso El gráfico muestra la concentración de lactato en el plasma sanguíneo antes, durante y después de un sprint de 400 m



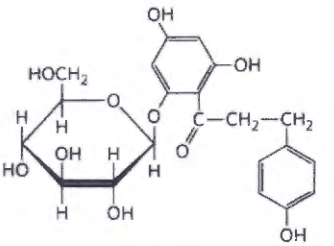
(a) ¿Cuál es la causa del rápido incremento en la concentración de lactato?

(b) ¿Cuál es la causa del descenso en la concentración de lactato después del sprint? ¿Por qué la disminución es más lenta que el aumento?

(c) ¿Por qué la concentración de lactato no es cero durante el estado de reposo?

27. Relación entre la fructosa 1,6-bisfosfatasa y los niveles de lactato en sangre Un defecto congénito en el enzima hepático fructosa 1,6-bisfosfatasa da lugar a unos niveles anormalmente elevados de lactato en el plasma sanguíneo. Explíquelo.

28. Efecto de la floridcina sobre el metabolismo de los glúcidos La floridcina, un glucósido tóxico de la corteza del peral, bloquea la reabsorción normal de la glucosa en el túbulo renal, provocando que prácticamente toda la glucosa de la sangre sea excretada en la orina. En un experimento, ratas alimentadas con floridcina y succinato sódico excretaron aproximadamente 0,5 moles de glucosa (producida en la gluconeogénesis) por cada mol de succinato sódico ingerido. ¿Cómo se transforma el succinato en glucosa?. Explica la estequiometría.



Floridcina

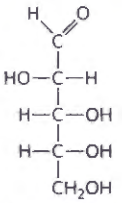
29. Exceso de captación de O_2 durante la gluconeogénesis El lactato absorbido por el hígado se convierte en glucosa. Este proceso requiere el aporte de 6 moles de ATP por cada mol de glucosa producido. La cuantía de este proceso puede medirse en una preparación de hígado de rata mediante administración de [^{14}C]lactato y midiendo la cantidad de [^{14}C]glucosa producida. Debido a que se conoce la estequiometría del consumo de O_2 y producción de ATP (unos 5 ATP por O_2) podemos predecir el consumo extra de O_2 por encima de la tasa normal cuando se administra una cantidad dada de lactato. Sin embargo, cuando se mide la cantidad de O_2 extra utilizada en la síntesis de glucosa a partir del lactato es, en realidad, siempre más elevada que la pronosticada por las relaciones estequiométricas conocidas. Sugiera una posible explicación para esta observación.

30. Función de la ruta de las pentosas fosfato Si se utilizase la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la ruta de las pentosas fosfato principalmente para generar NADPH para la biosíntesis se acumularía el otro producto, ribosa 5-fosfato. ¿Qué problemas podría causar esta situación?

Problema de análisis de Datos

31. Diseño de un sistema de fermentación La fermentación de materia vegetal para producir etanol y utilizarlo como combustible es un método potencial para reducir el uso de combustibles fósiles y así las emisiones de CO_2 que dan lugar al calentamiento global. Muchos microorganismos pueden de-

gradar la celulosa y a continuación fermentar la glucosa a etanol. No obstante, muchas fuentes potenciales de celulosa, incluidos residuos agrícolas, también contienen cantidades importantes de arabinosa que no fermenta fácilmente.



D-Arabinosa

Escherichia coli puede fermentar la arabinosa a etanol, pero no tolera normalmente niveles elevados de etanol, lo que limita su utilidad en la producción comercial de etanol. Otra bacteria, *Zymomonas mobilis*, tolera niveles elevados de etanol pero no fermenta la arabinosa. Deanda, Zhang, Eddy y Picataggio (1996) describieron sus esfuerzos para combinar las características más útiles de estos dos organismos introduciendo los genes de los enzimas del metabolismo de la arabinosa de *E. coli* en *Z. mobilis*.

(a) Por qué es ésta una estrategia más sencilla que la inversa: modificar *E. coli* para que tolere mejor el etanol?

Deanda y colaboradores insertaron cinco genes de *E. coli* en el genoma de *Z. mobilis*: *araA*, que codifica la L-arabinosa isomerasa, que convierte L-arabinosa y L-ribulosa; *araB*, L-ribuloquinasa, que utiliza ATP para fosforilar L-ribulosa en C-5; *araD*, L-ribulosa 5-fosfato epimerasa, que interconvierte L-ribulosa 5-fosfato y L-xilulosa 5-fosfato; *talB*, transaldolasa y *tktA*, transcetolasa.

Para cada uno de los tres enzimas *ara*, describa brevemente la transformación química que cataliza y, donde sea posible, nombre un enzima descrito en este capítulo que lleve a cabo una reacción análoga.

Los cinco genes de *E. coli* insertados en *Z. mobilis* permitieron la entrada de arabinosa en la fase no oxidativa de ruta de las pentosas fosfato (Fig. 14-23) en donde se convirtió en glucosa 6-fosfato y fermentó a etanol.

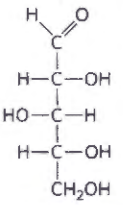
(c) En que azúcar convirtieron finalmente la arabinosa los tres enzimas *ara*?

(d) El producto del apartado (c) alimenta la ruta mostrada en la Figura 14-23. Combinando los cinco enzimas de *E. coli* señalados anteriormente con los enzimas de esta ruta, describa la ruta global para la fermentación de seis moléculas de arabinosa a etanol.

(e) ¿Cuál es la estequiometría de la fermentación de seis moléculas de arabinosa a etanol y CO_2? ¿Cuantas moléculas de ATP esperaría que generase esta reacción?

(f) *Z. mobilis* utiliza un ruta ligeramente diferente para la fermentación de etanol de la descrita en este capítulo. El resultado es que sólo se produce 1 ATP por molécula de arabinosa. Aunque ellos es menos beneficioso para la bacteria, es mejor para la producción de etanol. ¿Por qué?

Otro azúcar que se encuentra frecuentemente en la materia vegetal es la xilosa.



D-xilosa

(g) ¿Qué otros enzimas debería introducir en la cepa de *Z. mobilis* antes descrita para que pudiese utilizar tanto xilosa como arabinosa para producir etanol? No es necesario que nombre los enzimas (¡puede que incluso no existan en el mundo real!); dé solamente las reacciones que habrían de catalizar.

COPY-STATION

Referencia

Deanda, K., M. Zhang, C. Eddy, and S. Picataggio. 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol. 62*:4465–4470.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 15

Principios de regulación metabólica

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

15.1 Regulación de las rutas metabólicas 574

15.2 Análisis del control metabólico 582

15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis 587

15.4 Metabolismo del glucógeno en animales 598

15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno 603

COPY-STATION

La regulación metabólica, uno de los temas centrales de la bioquímica, es una de las características más notables de los organismos vivos. De los millares de reacciones catalizadas enzimáticamente que pueden tener lugar en la célula, es probable que no haya ninguna que se escape de una forma u otra de regulación. Esta necesidad de regular cada aspecto del metabolismo celular resulta clara cuando se examina la complejidad de las secuencias de reacciones metabólicas. Aunque es conveniente para el estudiante de bioquímica dividir los procesos metabólicos en "rutas" que juegan papeles concretos en la economía celular, tal separación no existe en la célula viva. Por el contrario, cada una de las rutas que se examinan en este libro está inextricablemente entrelazada con todas las demás rutas celulares en una red multidimensional de reacciones **(Fig. 15-1)**. Por ejemplo, en el Capítulo 14 describimos cuatro posibles destinos para la **glucosa 6-fosfato** en un hepatocito: degradación por la glucólisis para la producción de ATP, degradación por la ruta de las pentosas fosfato para la producción de NADPH y pentosas fosfato, utilización en la síntesis de polisacáridos complejos de la matriz extracelular, o hidrólisis a glucosa y fosfato para reponer la glucosa sanguínea. De hecho, la glucosa 6-fosfato tiene también otros destinos posibles en el hepatocito; puede, por ejemplo, utilizarse para sintetizar otros azúcares, tales como glucosamina, galactosa, galactosamina, fucosa y ácido neuramínico, para utilizarse en la glucosilación de proteínas, o puede ser degradada parcialmente para proporcionar acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y esteroles. La bacteria *Escherichia coli* puede utilizar la glucosa para producir el esqueleto carbonado de *cada una* de sus varios millares de moléculas diferentes. Cuando una célula utiliza la glucosa 6-fosfato para un fin determinado, tal "decisión" afecta a todas las demás vías en las que la glucosa 6-fosfato es un precursor o intermediario; cualquier cambio en la asignación de la glucosa 6-fosfato a una ruta afecta, directa o indirectamente, el flujo de metabolito a través de todas las demás.

Tales cambios en la asignación son comunes en la vida de una célula. Louis Pasteur fue el primero en describir el gran incremento, más de 10 veces, en el consumo de glucosa por un cultivo de levadura cuando pasaba de condiciones aeróbicas a anaeróbicas. Este "efecto Pasteur" se produce sin un cambio significativo de la concentración de ATP o de la mayoría de los centenares de intermediarios metabólicos y productos derivados de la glucosa. Un cambio similar tiene lugar en las células del músculo esquelético cuando un esprínter realiza la salida. La capacidad de una célula para llevar a cabo simultáneamente estos procesos metabólicos entrelazados (obteniendo cada producto en la cantidad necesaria en el momento adecuado, en presencia de perturbaciones importantes desde el exterior y sin generar productos de desecho) es un logro *asombroso*.

En este capítulo analizaremos el metabolismo de la glucosa con el fin de ilustrar algunos principios generales de la regulación metabólica. En primer lugar consideraremos los papeles generales de la regulación para alcanzar la homeostasis metabólica e introduciremos el análisis del control metabólico, un sistema para tratar cuantitativamente interacciones metabólicas complejas. A continuación describiremos las propiedades reguladoras específicas de los enzimas individuales que participan en el metabolismo de la glucosa; en el caso de la glucólisis y de la gluconeogénesis las actividades catalíticas de sus enzimas se describieron en el Capítulo 14. Aquí también discutiremos las propiedades catalíticas y reguladoras de los enzimas de la síntesis y degradación

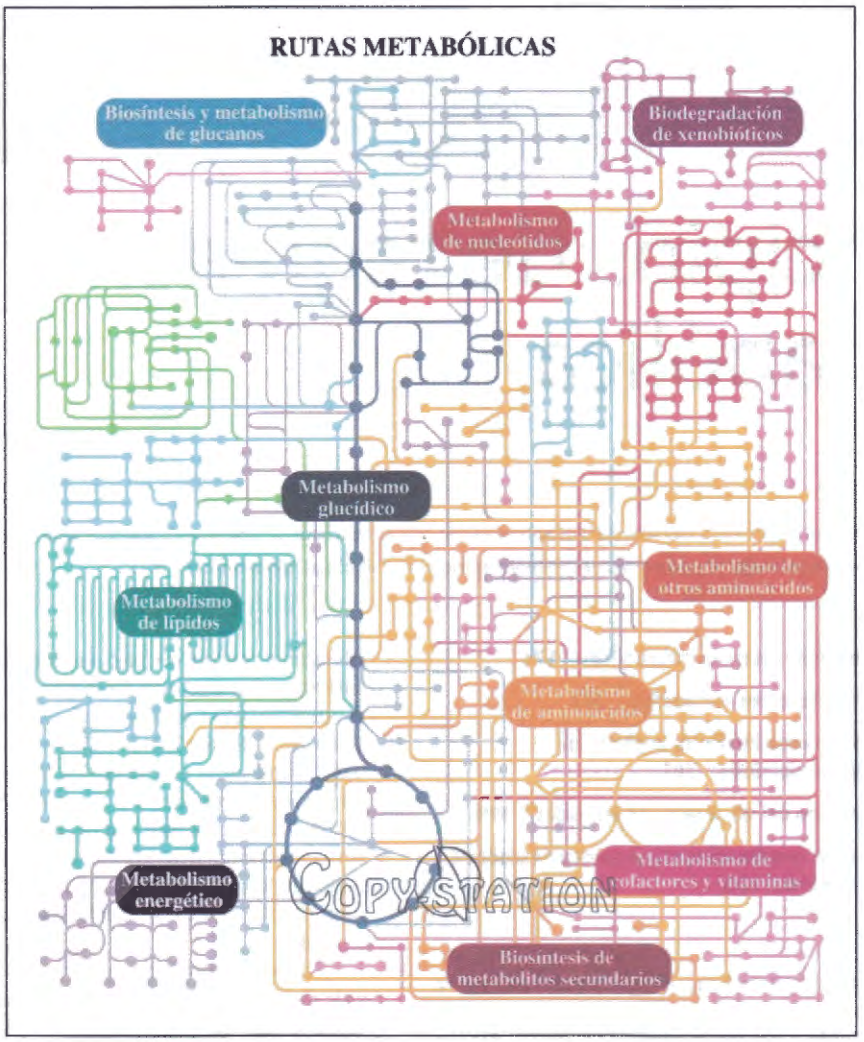


FIGURA 15-1 Metabolismo en forma de malla tridimensional. Una célula eucariótica típica tiene la capacidad de sintetizar unas 30.000 proteínas diferentes que catalizan miles de reacciones diferentes en las que intervienen muchos centenares de metabolitos, la mayoría compartidos por más de una "ruta". En esta visión general muy simplificada de las rutas metabólicas cada punto representa un compuesto intermediario y cada línea de conexión representa una reacción enzimática. Para un diagrama del metabolismo mucho más complejo y realístico veáse la base de datos online PATHWAY de KEGG (www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html); en este mapa interactivo se puede clicar sobre cada punto para obtener datos ampliados sobre el compuesto y los enzimas para los que es sustrato. [Fuente: www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html].

del glucógeno, uno de los casos mejor estudiados de regulación metabólica. Observe que al seleccionar el metabolismo glucídico para ilustrar los principios de la regulación metabólica, hemos separado de forma artificial el metabolismo de las grasas y de los glúcidos. De hecho, estas dos actividades están estrechamente integradas tal como veremos en el Capítulo 23.

15.1 Regulación de las rutas metabólicas

Las rutas del metabolismo de la glucosa proporcionan, en la dirección catabólica, la energía esencial para oponerse a las fuerzas de la entropía y, en la dirección anabólica, precursores biosintéticos y una forma de almacenamiento de energía metabólica. Estas reacciones son tan importantes para la supervivencia que han aparecido mecanismos reguladores muy complejos para asegurar que los metabolitos transcurren a través de cada ruta en la dirección correcta y a la velocidad también correcta para satisfacer exactamente las circunstancias cambiantes de la célula o del organismo. Mediante diversos mecanismos que actúan a escalas de tiempo diferentes se producen los ajustes adecuados en la velocidad del flujo metabólico a través de toda la ruta cuando se producen cambios en las circunstancias externas.

A veces, las circunstancias cambian de manera espectacular. Por ejemplo, la demanda de producción de ATP en el músculo volador de un insecto puede aumentar en un factor de 100 en unos pocos segundos cuando el insecto se pone a volar. En los humanos, la disponibilidad de oxígeno puede disminuir debido a la hipoxia (disminución en el suministro de oxígeno a los tejidos) o en la isquemia (descenso en el flujo de sangre a los tejidos). La curación de heridas requiere grandes cantidades de energía y precursores biosintéticos. Las

proporciones relativas de glúcido, grasa y proteína en la dieta varían de comida a comida y el suministro de combustibles obtenidos de la dieta es intermitente, lo que requiere ajustes metabólicos entre comidas y durante los períodos de inanición.

Las células y organismos mantienen un estado estacionario dinámico

Combustibles tales como la glucosa entran en una célula y productos de desecho tales como el CO_2, salen de la misma, pero la masa y la composición aproximada de una célula, órgano o animal típicos no cambian de manera apreciable con el transcurso del tiempo; las células y los organismos existen en un estado estacionario dinámico. Para cada reacción metabólica en una ruta, el sustrato es proporcionado por la reacción precedente a la misma velocidad a la que se convierte en producto. Así, aunque la velocidad (v) del flujo metabólico, o **flujo**, a través de este paso de la ruta pueda ser alto y variable, la concentración del sustrato, S, permanece constante. Así para la reacción en dos pasos

$$A \xrightarrow{v_1} S \xrightarrow{v_2} P$$

cuando $v_1 = v_2$, [S] es constante. Por ejemplo, los cambios en v_1 para la entrada de glucosa de diversos orígenes en la sangre se equilibran mediante cambios en v_2 para la captación de glucosa de la sangre en los diversos tejidos, de modo que la concentración de glucosa sanguínea ([S]) se mantiene aproximadamente constante en 5 mM. Esto es la **homeostasis** a nivel molecular. El fallo en los mecanismos homeostáticos se encuentra a menudo en la raíz de las enfermedades humanas. En la diabetes mellitus, por ejemplo, la regulación de la concentración de glucosa sanguínea es defectuosa a consecuencia de la falta de insulina o de sensibilidad a la misma, lo que acarrea consecuencias médicas graves.

Cuando la perturbación externa no es meramente transitoria, o cuando una clase de célula se desarrolla dando otra, los ajustes en la composición y el metabolismo celulares pueden ser más grandes pudiendo requerir cambios significativos y duraderos en la adjudicación de energía y precursores sintéticos para lograr un nuevo estado estacionario dinámico. Considere, por ejemplo, la diferenciación de las células madre de la médula ósea en eritrocitos. La célula precursora contiene un núcleo, mitocondrias y muy poca hemoglobina, si la hay, mientras que el eritrocito totalmente diferenciado contiene cantidades enormes de hemoglobina pero no tiene núcleo ni mitocondrias; la composición celular ha cambiado de manera permanente en respuesta a señales de desarrollo externas, con los cambios consiguientes en el metabolismo. Esta **diferenciación celular** requiere una regulación precisa de los niveles de proteínas celulares.

En el transcurso de la evolución, los organismos adquirieron una colección notable de mecanismos reguladores para mantener la homeostasis a los niveles molecular, celular y del organismo reflejada en la proporción relativa de genes que codifican la maquinaria reguladora. En los humanos unos 2.500 genes (~12% de todos los genes) codifican proteínas reguladoras, entre las que se encuentran una serie de receptores, reguladores de la expresión génica y ¡más de 800 proteína quinasas diferentes! En muchos casos, los mecanismos reguladores se solapan: un enzima está sujeto a regulación por varios mecanismos diferentes.

Se pueden regular tanto la cantidad como la actividad catalítica de un enzima

El flujo a través de una reacción catalizada por un enzima puede modularse mediante cambios en el *número* de moléculas de enzima o mediante cambios en la *actividad catalítica* de cada molécula enzimática ya presente. Tales cambios tienen lugar en escalas de tiempo que van desde milisegundos a muchas horas, en respuesta a señales desde el interior o el exterior de la célula. Los cambios alostéricos, que son muy rápidos, se desencadenan generalmente de forma local mediante cambios en la concentración local de un molécula pequeña, un sustrato de la ruta en la que la reacción es un paso (glucosa en la glucólisis, por ejemplo), un producto de la ruta (ATP de la glucólisis) o un metabolito o cofactor clave (tal como el NADH) que indica el estado metabólico de la célula. Los segundos mensajeros (tales como AMP cíclico y Ca^{2+}) generados intracelularmente en respuesta a señales extracelulares (hormonas, citoquinas, etc.) también intervienen en la regulación alostérica, en una escala de tiempo ligeramente más lenta impuesta por la velocidad del mecanismo de transducción de señal (véase el Capítulo 12).

Las señales extracelulares (**Fig. 15-2**, ❶) pueden ser hormonales (insulina o adrenalina, por ejemplo) o neuronales (acetilcolina), o pueden ser factores de crecimiento o citoquinas. El número de moléculas de un enzima dado en una célula es función de las velocidades relativas de síntesis y de degradación de dicho enzima. La velocidad de síntesis puede ajustarse por la activación (en respuesta a alguna señal exterior) de un factor de transcripción (Fig. 15-2, ❷; descrita con más detalle en el Capítulo 28), Los **factores de transcripción** son proteínas nucleares que, al activarse, se unen a regiones específicas del DNA (**elementos de respuesta**) cerca del promotor de un gen (su punto de inicio de la transcripción) activando o reprimiendo la transcripción del gen, lo que lleva a un aumento o disminución de la síntesis de la proteína codificada. La activación de un factor de transcripción es, a veces, el resultado de su unión a un ligando específico y otras veces consecuencia de su fosforilación o desfosforilación. Cada gen está controlado por uno o más elementos de respuesta que son reconocidos por factores de transcripción específicos. Los genes que tienen varios elementos de respuesta son, por tanto, controlados por varios factores de transcripción con lo que responden a varias señales diferentes. Grupos de genes que codifican proteínas que actúan conjuntamente, tales como los enzimas de la glucólisis o de la gluconeogénesis, a menudo comparten secuencias de elementos de respuesta comunes, de modo que una única señal, que actúa a través de un factor de transcripción determinado, activa o inhibe todos estos genes conjuntamente. La regulación del metabolismo de los glúcidos por factores de transcripción específicos se examina en la Sección 15.3.

COPYSTATION

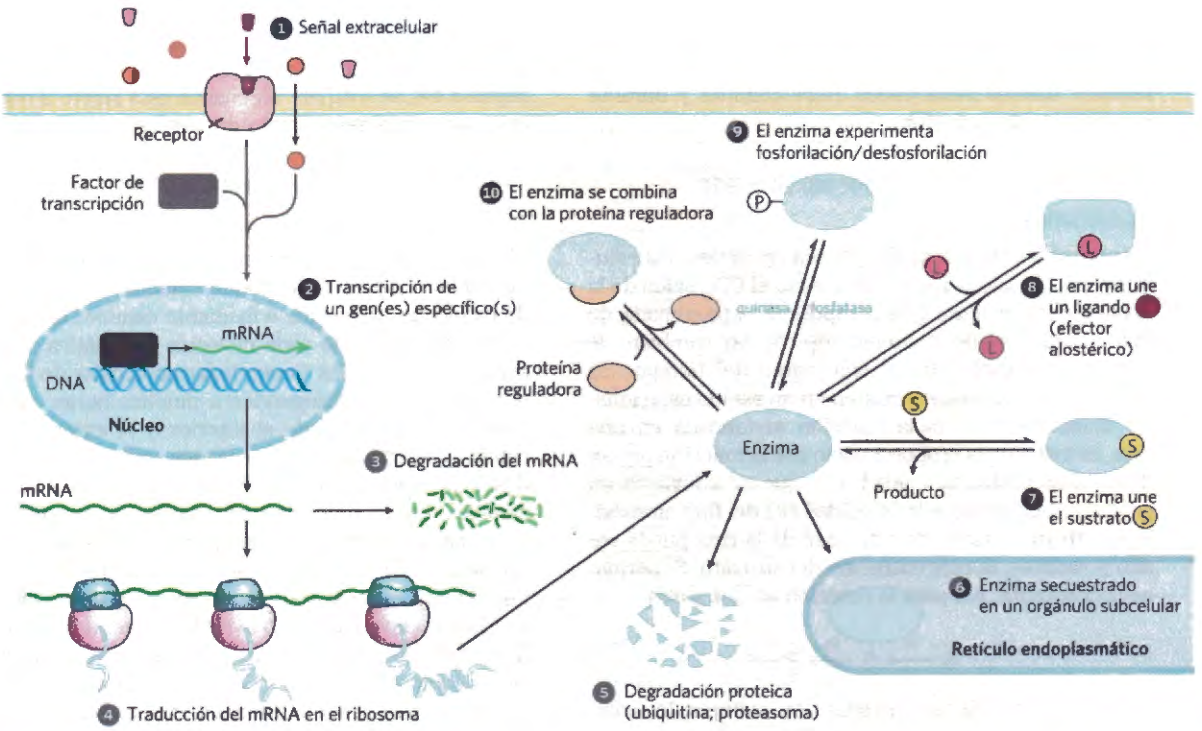


FIGURA 15-2 Factores que afectan la actividad de los enzimas. La actividad total de un enzima puede cambiarse mediante alteración del *número* de sus moléculas en la célula o su actividad *efectiva* en un compartimiento subcelular (❶ a ❻), o modulando la *actividad* de las moléculas existentes (❼ a ❿), tal como se detalla en el texto. Un enzima puede ser influido por una combinación de tales factores.

COPY STATION

La estabilidad de los mRNA mensajeros, su resistencia a la degradación por las ribonucleasas celulares (Fig. 15-2, ❸), varía de modo que la cantidad de un mRNA dado en la célula es una función de sus velocidades de síntesis y degradación (Capítulo 26). La velocidad a la que se traduce un mRNA a proteína en el ribosoma (Fig. 15-2, ❹) también está regulada y depende de varios factores descritos detalladamente en el Capítulo 27. Observe que un incremento de n veces en un mRNA no siempre significa un incremento de n veces de su producto proteico.

Una vez sintetizadas, las moléculas de proteína tienen una vida finita, que puede ir de minutos a muchos días (Tabla 15-1). La velocidad de degradación proteica (Fig. 15-2, ❺) difiere de un enzima a otro y depende de las condiciones celulares. Algunas proteínas son marcadas para su degradación en proteasomas mediante unión covalente de ubiquitina, tal como se discute en el Capítulo 27 (véase, por ejemplo, el caso de la ciclina en la Fig. 12-35). El **recambio** rápido (síntesis seguida de degradación) es caro energéticamente, pero las proteínas con una vida corta pueden alcanzar nuevos niveles de estado estacionario mucho más rápidamente que las que tienen una vida larga; el beneficio de esta capacidad de respuesta rápida debe equilibrar o superar el coste para la célula.

Aún otra forma de alterar la actividad *efectiva* de un enzima es secuestrar el enzima y su sustrato en compartimientos diferentes (Fig. 15-2, ❻). En el músculo, por ejemplo, la hexoquinasa no puede actuar sobre la glucosa hasta que el azúcar entra en el miocito procedente de la sangre al tiempo que la velocidad a la que entra depende de la actividad de transportadores de glucosa (véase la Tabla 11-3) de la membrana plasmática. En el interior de las células, compartimientos limitados por membranas segregan ciertos enzimas y sistemas enzimáticos y el transporte de sustratos a estos compartimientos puede constituir el factor limitante de la acción enzimática.

Como resultado de estos diversos mecanismos para regular la concentración de enzima, las células pueden cambiar de manera espectacular su dotación de enzimas en respuesta a variaciones en las circunstancias metabólicas. En los vertebrados, el hígado es el tejido más adaptable; por ejemplo, un cambio en la dieta desde una elevada cantidad de glúcidos a alta cantidad de lípidos, afecta la transcripción de centenares de genes y, de ahí, la concentración de centenares de proteínas. Estos cambios globales en la expresión génica se pueden cuantificar mediante el uso de microchips de DNA (véase la Fig. 9-23) que ponen de manifiesto la dotación completa de los mRNA presen-

TABLA 15-1 Vida media promedio de proteínas en tejidos de mamíferos

Tejido	Vida media promedio (días)
Hígado	0,9
Riñón	1,7
Corazón	4,1
Cerebro	4,6
Músculo	10,7

tes en un tipo celular o tejido dado (el **transcriptoma**) o mediante electroforesis bidimensional en gel (véase la Fig. 3-21) que pone de manifiesto la dotación proteica de un tipo celular u órgano (su **proteoma**). Ambas técnicas proporcionan muchos conocimientos sobre la regulación metabólica. El efecto de cambios en el proteoma es a menudo un cambio en el conjunto total de metabolitos de baja masa molecular, el **metaboloma (Fig. 15-3)**. El metaboloma de *E. coli* cuando crece en glucosa está dominado por unas pocas clases de metabolitos: glutamato (49%); nucleótidos (principalmente ribonucleósidos trifosfato) (15%); intermediarios de la glucólisis, ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato (rutas centrales del metabolismo del carbono) (15%) y cofactores redox y glutationes (9%).

Cuando los mecanismos reguladores que intervienen en la síntesis y degradación de proteínas han producido un cierto número de moléculas de cada enzima en una célula, la actividad de estos enzimas aún puede ser regulada de otras maneras: por la concentración de sustrato, la presencia de efectores alostéricos, modificaciones covalentes o unión de proteínas reguladoras, todas las cuales pueden cambiar la actividad de una molécula individual de enzima (Fig. 15-2, ❼ a ❿).

Todos los enzimas son sensibles a la concentración de su sustrato(s) (Fig. 15-2, ❼). recuerde que en el caso más sencillo (un enzima que siga la cinética de Michaelis-Menten), la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la máxima cuando el sustrato está presente a una concentración igual a K_m (es decir, cuando el enzima está semisaturado con el sustrato). La actividad disminuye a [S] más bajas y cando [S] << K_m la velocidad de la reacción depende de [S] de manera lineal.

La relación entre [S] y K_m es importante porque las concentraciones intracelulares de sustrato son a menudo del mismo orden, o más bajas, que la K_m. La actividad de la hexoquinasa, por ejemplo, cambia con la [glucosa] y la [glucosa] intracelular varía con la concentración de glucosa de la sangre. Tal como veremos, las diferentes formas (isozimas) de la hexoquinasa tienen diferentes valores de K_m y quedan, por tanto, afectadas de manera diferente con los cambios de la [glucosa] intracelular, de maneras que tienen sentido fisiológico. Para diversas reacciones de transferencia de fosforilo y reacciones redox que utilizan NADPH o NAD^+, la concentración de metabolito es muy superior a la K_m **(Fig. 15-4)**; no es probable que estos cofactores sean los factores limitantes de velocidad en tales reacciones.

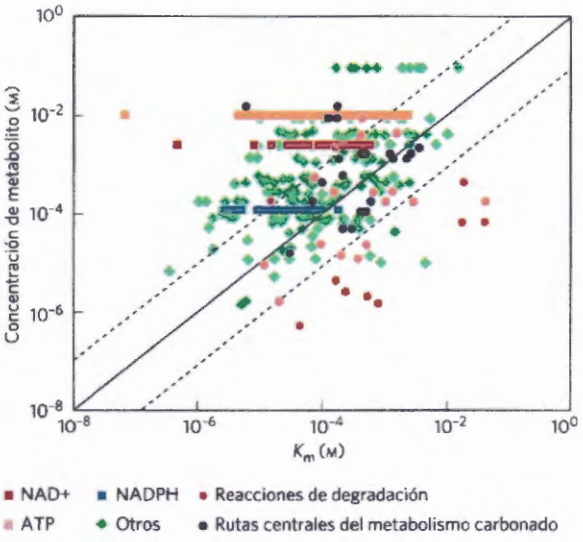


FIGURA 15-4 Comparación entre la K_m y la concentración de sustrato de diversos enzimas metabólicos. Se representan las concentraciones medidas de metabolitos en *E. coli* que crece sobre glucosa, frente a la K_m conocida de enzimas que consumen dicho metabolito. La línea continua es la línea de unidad (en la que la concentración de metabolito = K_m), y las líneas a trazos denotan cada una una desviación de diez veces respecto a la línea de unidad. [Fuente: Datos de B. D. Bennett et al., *Nature Chem. Biol.* 5:593, 2009, Fig. 2].

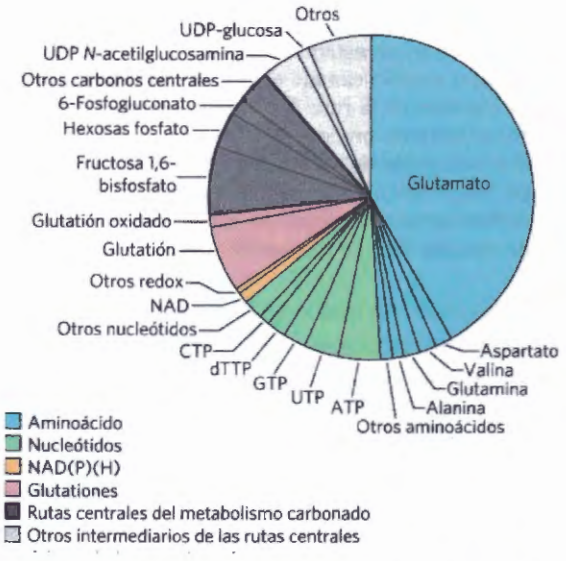


FIGURA 15-3 Metaboloma de *E. coli* creciendo sobre glucosa. Resumen de las cantidades de 103 metabolitos medidos mediante una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). [Fuente: Datos de B. D. Bennett et al., *Nature Chem. Biol.* 5:593, 2009, Fig. 1].

EJEMPLO PRÁCTICO 15-1 Actividad de un transportador de glucosa

Si K_t (el equivalente de K_m) para el transportador hepático de glucosa (GLUT2) es 40 mM, calcule el efecto sobre la velocidad de flujo de glucosa al interior de un hepatocito al incrementar la concentración de glucosa de 3 mM a 10 mM.

Solución: Utilizamos la Ecuación 11-1 para encontrar la velocidad inicial (flujo) de captación de glucosa

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_{out}}{K_t + [S]_{out}}$$

A glucosa 3 mM

$$V_0 = V_{max}(3\text{ mM})/(40\text{ mM} + 3\text{ mM})$$
$$= V_{max}(3\text{ mM}/43\text{ mM}) = 0.07\,V_{max}$$

A glucosa 10 mM

$$V_0 = V_{max}(10\ mM)/(40\ mM + 10\ mM)$$
$$= V_{max}(10\ mM/50\ mM) = 0.20\ V_{max}$$

Por tanto, un incremento de glucosa de 3 mM a 10 mM incrementa la velocidad de entrada de glucosa en el hepatocito en un factor 0,20/0,07 ≈ 3.

Se puede aumentar o disminuir la actividad enzimática mediante un efector alostérico (Fig. 15-2, ❽; véase la Fig. 6-35). De forma típica los efectores alostéricos convierten la cinética hiperbólica en cinética sigmoidea, o viceversa (véase la Fig. 15-16b, por ejemplo). En la parte con pendiente más pronunciada de la curva sigmoidea, un pequeño cambio en la concentración de sustrato, o de efector alostérico, puede tener un gran impacto en la velocidad de reacción. Recuerde del Capítulo 5 que la cooperatividad de una proteína alostérica se puede expresar con el coeficiente de Hill; cuanto más elevado el coeficiente mayor es la cooperatividad. Para un enzima alostérico con un coeficiente de Hill de 4, la actividad aumenta desde el 10% de V_{max} al 90% de V_{max} con sólo un incremento de 3 veces en [S], comparado con el incremento de 81 veces en [S] para un enzima sin efectos cooperativos (coeficiente de Hill de 1; Tabla 15-2).

Las modificaciones covalentes de enzimas u otras proteínas (Fig. 15-2; ❾) tienen lugar en segundos o minutos después de recibir una señal reguladora, normalmente una señal extracelular. Con mucho las modificaciones más comunes son la fosforilación y la desfosforilación **(Fig. 15-5)**; hasta la mitad de las proteínas de una célula eucariótica se fosforilan en algunas circunstancias. La fosforilación por una proteína quinasa específica puede alterar las características electrostáticas del sitio activo de un enzima, producir el movimiento de una región inhibidora de la proteína enzimática hacia fuera del sitio activo, alterar la interacción del enzima con otras proteínas o forzar cambios de conformación que se traducen en cambios de V_{max} o de K_m. Para que la modificación covalente sea útil en la regulación, la célula debe ser capaz de volver el enzima alterado a su condición de actividad original. Una familia de fosfoproteína fosfatasas, algunas de las cuales como

TABLA 15-2 Relación entre el coeficiente de Hill y el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción en los enzimas alostéricos

Coeficiente de Hill (n_H)	Cambio en [S] requerido para aumentar V_0 desde 10% a 90% de V_{max}
0,5	X6.600
1,0	X81
2,0	X9
3,0	X4,3
4,0	X3

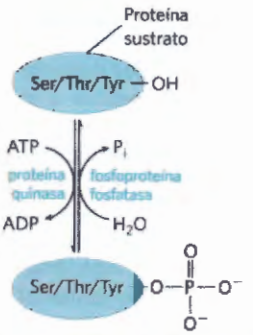


FIGURA 15-5 Fosforilación y desfosforilación de proteínas. Las proteína quinasas transfieren un grupo fosforilo desde el ATP a residuos Ser, Thr, o Tyr en un enzima u otros sustratos proteicos. Las proteína fosfatasas eliminan el grupo fosforilo en forma de P_i.

mínimo también están sujetas a regulación, catalizan la desfosforilación de proteínas.

Finalmente, muchos enzimas están regulados por asociación y disociación de otra proteína reguladora (Fig. 15-2, ❿). Por ejemplo, la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA; véase la Fig. 12-6) es inactiva hasta que el cAMP separa las subunidades catalíticas del enzima de las reguladoras.

estos diversos mecanismos que alteran el flujo a través de un paso de una ruta metabólica no son mutuamente excluyentes. Es muy frecuente que un mismo enzima esté regulado a nivel de la transcripción así como por mecanismos alostéricos y covalentes. La combinación proporciona una regulación rápida, suave y efectiva a respuesta a un gran número de perturbaciones y señales.

En la discusión que sigue, es útil pensar que los cambios en la actividad enzimática sirven para llevar a cabo dos funciones distintas aunque complementarias. Utilizamos el término **regulación metabólica** para referirnos a procesos que sirven para mantener la homeostasis a nivel molecular, para mantener algún parámetro celular (concentración de un metabolito por ejemplo) en un estado estacionario a lo largo del tiempo, aun cuando cambie el flujo de metabolitos a través de cambios en la ruta. El término **control metabólico** se refiere a un proceso que conduce a una variación en el rendimiento de una vía metabólica durante el tiempo en respuesta a alguna señal exterior o cambio en las circunstancias externas. La distinción, aunque útil, no es siempre fácil de reconocer.

En las células las reacciones lejos del equilibrio constituyen puntos comunes de regulación

En algunos pasos de una ruta metabólica, la reacción está próxima al equilibrio dentro de la célula en su estado estacionario dinámico **(Fig. 15-6)**. El flujo neto de metabolitos a través de estos pasos es la pequeña diferencia entre las velocidades de las reacciones directa e inversa, velocidades que son muy similares cuando la reacción está próxima al equilibrio. Pequeños cambios en la concentración de sustrato o de producto pueden dar lugar a grandes variaciones en la velocidad neta y pueden, incluso, cambiar la dirección del flujo neto. Podemos identificar estas reacciones próximas al equilibrio en un célula comparando su **razón de acción de**

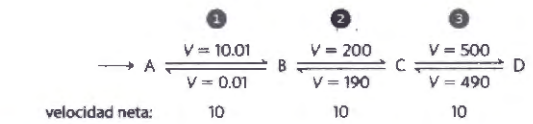


FIGURA 15-6 Etapas cerca del equilibrio y lejos del equilibrio en una ruta metabólica. Las etapas ❷ y ❸ de esta ruta están cerca del equilibrio en la célula; en cada paso su velocidad (V) en el sentido directo es sólo ligeramente superior a la velocidad en el sentido inverso por lo que la velocidad directa neta (10) es relativamente baja y la variación de energía libre $\Delta G'$ es próxima a cero. Un aumento en la [C] o [D] puede invertir la dirección de estos pasos. El paso ❶ se mantiene en la célula lejos del equilibrio; su velocidad en el sentido directo es mucho mayor que en el inverso. La velocidad neta del paso ❶ (10) es mucho mayor que la velocidad inversa (0,01) siendo idéntica a las velocidades netas de los pasos ❷ y ❸ cuando la ruta está funcionando en estado estacionario. El paso ❶ tiene una $\Delta G'$ grande y negativa.

masas, Q, con la constante de equilibrio de la reacción K'_{eq}. Recuerde que para la reacción A + B ⟶ C + D, Q = [C][D]/[A][B]. Cuando Q y K'_{eq} se encuentran dentro de 1 ó 2 órdenes de magnitud, la reacción está cerca del equilibrio. Éste es el caso en seis de las diez reacciones de la ruta glucolítica (Tabla 15-3).

Otras reacciones están lejos del equilibrio en la célula. Por ejemplo, la K'_{eq} de la reacción de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) es alrededor de 1000, pero Q ([fructosa 1,6-bisfosfato][ADP]/[fructosa 6-fosfato][ATP]) en un hepatocito en el estado estacionario es alrededor de 0,1 (Tabla 15-3). Esto es *debido a que* la reacción está tan lejos del equilibrio que el proceso es exergónico en condiciones celulares y tiende a ir en la dirección hacia adelante. La reacción se mantiene lejos del equilibrio porque, en las condiciones para el sustrato, producto y efector que prevalecen en la célula, la velocidad de conversión de la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato está limitada por la actividad de la PFK-1, la cual, a su vez, está limitada por el número de moléculas de PFK-1 presentes y por las acciones de efectores alostéricos. Así la velocidad hacia adelante neta de la reacción catalizada enzimáticamente es igual al flujo neto de intermediarios glucolíticos a través de otros pasos en la ruta mientras que el flujo inverso a través de la PFK-1 permanece próximo a cero.

La célula *no puede* permitir que las reacciones con constantes de equilibrio grandes alcancen el equilibrio. Si la [fructosa 6-fosfato], [ATP] y [ADP] en la célula se mantuviesen en sus valores normales (concentración milimolar baja) y se permitiese que la reacción de la PFK-1 alcanzase el equilibrio por un aumento en la [fructosa 1,6-bisfosfato], la concentración de fructosa 1,6-bisfosfato aumentaría al nivel molar lo que causaría estragos osmóticos en la célula. Considérese otro caso: si se permitiese que la reacción ATP ⟶ ADP + P_i se acercase al equilibrio en la célula, la variación de energía libre real ($\Delta G'$) para esta reacción (ΔG_p; véase el Ejemplo práctico 13-2, p. 519) se acercaría a cero con lo que el ATP perdería el elevado potencial de transferencia del grupo fosforilo que lo hace valioso para la célula. Es, por tanto, esencial que los enzimas que catalizan la rotura del ATP y otras reacciones muy exergónicas en una célula sean sensibles a la regulación, de modo que cuando circunstancias externas fuerzan cambios metabólicos se ajuste el flujo a través de estos enzimas para asegurar que la [ATP] permanece muy por encima de su nivel de equilibrio. Cuando se producen tales cambios

Copyrighted Material

TABLA 15-3 Constantes de equilibrio, coeficientes de acción de masas y variaciones de energía libre de los enzimas del metabolismo glucídico

Enzima	K'_{eq}	Razón de acción de masas, Q		¿Reacción cerca del equilibrio in vivo?[a]	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol) en corazón
		Hígado	Corazón			
Hexoquinasa	1×10^{3}	2×10^{-2}	8×10^{-2}	No	–17	–27
PFK-1	1.0×10^{3}	9×10^{-2}	3×10^{-2}	No	–14	–23
Aldolasa	1.0×10^{-4}	$1{,}2 \times 0^{-6}$	9×10^{-6}	Yes	+24	–6,0
Triosa fosfato isomerasa	4×10^{-2}	—[b]	2.4×10^{-1}	Yes	+7,5	+3,8
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa + fosfoglicerato quinasa	2×10^{3}	6×10^{2}	9.0	Yes	–13	+3,5
Fosfoglicerato mutasa	1×10^{-1}	1×10^{-1}	$1{,}2 \times 10^{-1}$	Yes	+4.4	+0,6
Enolasa	3	2.9	1.4	Yes	–3,2	–0,5
Piruvato quinasa	2×10^{4}	7×10^{-1}	40	No	–31	–17
Fosfoglucosa isomerasa	4×10^{-1}	$3{,}1 \times 10^{-1}$	$2{,}4 \times 10^{-1}$	Yes	+2,2	–1,4
Piruvato carboxilasa + PEP carboxiquinasa	7	1×10^{-3}	—[b]	No	–5,0	–23
Glucosa 6-fosfatasa	8.5×10^{2}	$1{,}2 \times 10^{2}$	—[b]	Yes	–17	–5,0

Fuente: K'_{eq} y Q se han tomado de Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) *Regulation in Metabolism*, Wiley Press, New York, pp. 97, 263. $\Delta G'$ y $\Delta G'^{\circ}$ se calcularon a partir de estos datos.

[a]Con el fin de simplificar, cualquier reacción para la que el valor absoluto de la $\Delta G'$ calculada es inferior a 6 se considera próxima al equilibrio.

[b]Datos no disponibles.

metabólicos, se ajustan las actividades enzimáticas de todas las rutas interconectadas para mantener estos pasos críticos lejos del equilibrio. Así, no debe sorprender que muchos enzimas (tales como la PFK-1) que catalizan reacciones muy exergónicas estén sujetas a una serie de sutiles mecanismos de regulación. La multiplicidad de estos ajustes es tan grande que del examen de las propiedades de cualquier enzima de una ruta no podemos predecir si este enzima tiene una influencia fuerte sobre el flujo neto de la ruta completa. Se puede realizar una aproximación a este problema complejo mediante análisis del control metabólico tal como se describe en la Sección 15.2.

Los nucleótidos de adenina juegan un papel especial en la regulación metabólica

Después de la protección de su DNA contra las lesiones, quizá nada es más importante para una célula que mantener constante el suministro y concentración de ATP. Muchos enzimas que utilizan ATP tienen valores de K_m entre 0,1 y 1 mM siendo la concentración de ATP en una célula típica alrededor de 5 mM (Fig. 15-4). Si la [ATP] disminuyese significativamente, estos enzimas no estarían totalmente saturados por su sustrato (ATP) y disminuiría la velocidad de centenares de reacciones en las que interviene el ATP **(Fig. 15-7)**; probablemente, la célula no sobreviviría a este efecto *cinético* sobre tantas reacciones.

Existe además un importante efecto *termodinámico*, a causa de la menor [ATP]. Debido a que el ATP se convierte en ADP o AMP, cuando se "gasta" para realizar trabajo celular, la razón [ATP]/[ADP] afecta profundamente todas las reacciones que emplean estos cofactores. Lo mismo es cierto para otros cofactores importantes, tales como NADH/NAD^+ y NADPH/$NADP^+$. Por ejemplo, considere la reacción catalizada por la hexoquinasa:

$$\text{ATP} + \text{glucosa} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glucosa 6-fosfato}$$

$$K'_{eq} = \frac{[\text{ADP}]_{eq}\,[\text{glucosa 6-fosfato}]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}[\text{glucosa}]_{eq}} = 2 \times 10^3$$

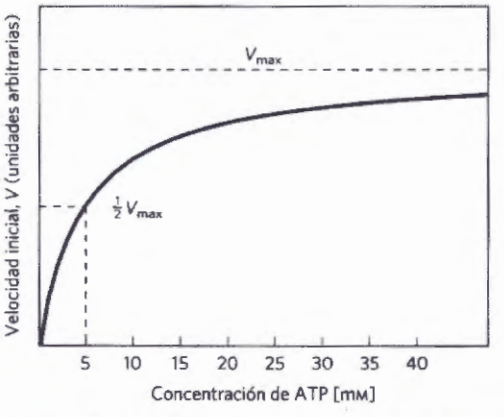


FIGURA 15-7 Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad inicial de un enzima dependiente de ATP típico. Estos datos experimentales dan una K_m para el ATP de 5mM. La concentración de ATP en los tejidos animales es ~5 mM.

Observe que esta expresión *sólo* es cierta cuando las concentraciones de reactivos y productos son las de *equilibrio*, cuando $\Delta G' = 0$. A cualquier otro conjunto de concentraciones $\Delta G'$ no es cero. Recuerde (del Capítulo 13) que la razón de productos a sustratos (la razón de acción de masas, Q) determina la magnitud y signo de $\Delta G'$ y, por tanto, la fuerza impulsora, ΔG, de la reacción:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{glucosa 6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glucosa}]}$$

Dado que una alteración de esta fuerza impulsora influye profundamente sobre cada reacción en la que interviene el ATP, los organismos se han encontrado bajo una gran presión evolutiva para desarrollar mecanismos reguladores que respondan a la razón [ATP]/[ADP].

La concentración de AMP es aun un indicador mucho más sensible del estado energético de la célula que la [ATP]. Normalmente, las células tienen una concentración de ATP (5 a 10 mM) mucho mayor que la de AMP (<0,1 mM). Cuando algún proceso (por ejemplo la contracción muscular), consume ATP, el AMP se produce en dos pasos. Primero, la hidrólisis del ATP produce ADP, a continuación la reacción catalizada por la **adenilato quinasa** produce AMP:

$$2\text{ADP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$$

Copy-Station

Si el ATP se consume de modo que su concentración disminuye en un 10%, el aumento *relativo* en la [AMP] es mucho mayor que el de la [ADP] (Tabla 15-4). No es sorprendente, por tanto, que muchos procesos reguladores dependan de cambios en la [AMP]. El mediador probablemente más importante de la regulación por AMP es la **proteína quinasa activada por AMP (AMPK)**, que responde a un incremento en la [AMP] fosforilando proteínas clave y regulando, de este modo, sus actividades. (No se ha de confundir la AMPK con la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico PKA; véase la Sección 15.5). El aumento en la [AMP] puede ser debida a una reducción en el suministro de nutriente o a un mayor ejercicio. AMP activa la AMPK de forma alostérica, dando lugar a un cambio conformacional que hace que la AMPK sea un buen sustrato para la fosforilación por otra proteína quinasa, LKB1. La fosforilación de un residuo Thr específico por la LKB1 activa muchas veces la AMPK. La LKB1, a su vez, está regulada por muchos factores, incluido el estrés metabólico. La acción de la AMPK aumenta el transporte de glucosa y activa la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos al tiempo que suprime los procesos que requieren energía tales como la síntesis de ácidos grasos, colesterol y proteínas **(Fig. 15-8)**. Por ejemplo, la AMPK hace que la síntesis del glucógeno sea más lenta al fosforilar e inhibir el enzima glucógeno sintasa (véase más adelante). Todos los cambios efectuados por la AMPK sirven para aumentar la [ATP] y disminuir la [AMP]. En el Capítulo 23 se discute el papel de la AMPK sobre el equilibrio del anabolismo y el catabolismo en el organismo completo.

Además del ATP, también han de estar presentes en la célula en concentraciones adecuadas cientos de inter-

TABLA 15-4 Cambios relativos en la [ATP] y [AMP] cuando se consume ATP

Nucleótido de adenina	Concentración antes de la desaparición del ATP (mM)	Concentración después de la desaparición del ATP (mM)	Cambio relativo
ATP	5,0	4,5	10%
ADP	1,0	1,0	0
AMP	0,1	0,6	600%

mediarios metabólicos. Por ejemplo, los intermediarios glucolíticos dihidroxiacetona fosfato y 3-fosfoglicerato son precursores de triacilgliceroles y serina, respectivamente. Cuando se necesitan estos productos, ha de ajustarse la velocidad de la glucólisis para proporcionarlos sin que se reduzca la producción glucolítica de ATP. Lo mismo es cierto para el mantenimiento de los niveles de otros cofactores importantes, tales como NADH y NADPH: las variaciones en sus cocientes de acción de masas (es decir, la razón de cofactor reducido a oxidado) tienen efectos globales sobre el metabolismo.

Por supuesto, las prioridades a nivel de *organismo* también han impulsado la evolución de los mecanismos reguladores. En los mamíferos, el cerebro no tiene prácticamente ninguna fuente de energía almacenada, por lo que depende de un aporte constante de glucosa desde la sangre. Si la glucosa sanguínea cae desde su concentración normal, entre 4 y 5 mM, a la mitad de este nivel, se produce confusión mental y una reducción de cinco veces en la glucosa sanguínea puede conducir a coma y muerte. Para tamponar estos cambios en la concentración de glucosa sanguínea, la liberación de las hormonas insulina y glucagón, promovida por valores de glucosa sanguínea altos o bajos, respectivamente, pone en marcha cambios metabólicos que tienden a retornar la concentración de glucosa en la sangre a su valor normal.

Otras presiones selectivas deben haber operado también a lo largo de la evolución, seleccionando mecanismos reguladores que consigan lo siguiente:

1. Maximizar la eficiencia en la utilización de combustibles impidiendo la operación simultánea de rutas en direcciones opuestas (tales como glucólisis y gluconeogénesis).
2. Distribuir los metabolitos adecuadamente entre rutas alternativas (tales como glucólisis y ruta de las pentosas fosfato).
3. Utilizar el combustible mejor adaptado a las necesidades inmediatas del organismo (glucosa, ácidos grasos, glucógeno o aminoácidos).
4. Frenar las rutas biosintéticas cuando se acumulan sus productos.

Los siguientes capítulos de este libro presentan muchos ejemplos de cada tipo de mecanismo regulador.

COPYRIGHT

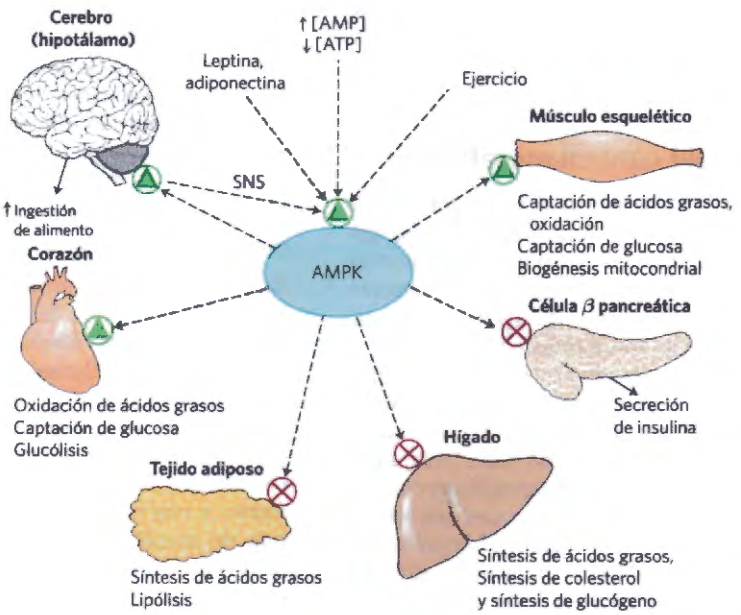


FIGURA 15-8 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el metabolismo de glúcidos y grasas. AMPK es activada por [AMP] elevada o por [ATP] disminuida, por el ejercicio, el sistema nervioso simpático (SNS) o por hormonas peptídicas producidas en el tejido adiposo (leptina y adiponectina, descritas con más detalle en el Capítulo 23). Cuando está activada, la AMPK fosforila proteínas diana y desplaza el metabolismo en diversos tejidos lejos de los procesos que consumen energía tales como la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y colesterol; desplaza el metabolismo en los tejidos extrahepáticos hacia el uso de ácidos grasos como combustible y desencadena la gluconeogénesis en el hígado para proporcionar glucosa al cerebro. En el hipotálamo, la AMPK estimula el comportamiento nutritivo para proporcionar más combustible con la dieta. [Fuente: Datos de N. V. Torres et al., *Biochem. J.* 234:169, 1986].

RESUMEN 15.1 Regulación de la rutas metabólicas

- En una célula metabólicamente activa en estado estacionario, los intermediarios se forman y consumen a velocidades iguales. Cuando una perturbación transitoria altera la velocidad de formación o consumo de un metabolito, variaciones compensatorias en las actividades enzimáticas devuelven el sistema al estado estacionario.
- Las células regulan su metabolismo mediante diferentes mecanismos que actúan en una escala de tiempo que va de menos de un milisegundo a días, sea cambiando la actividad de moléculas enzimáticas ya existentes sea variando el número de moléculas de un enzima específico.
- Diversas señales activan o inactivan factores de transcripción que actúan en el núcleo para regular la expresión génica. Los cambios en el transcriptoma conducen a cambios en el proteoma y, finalmente, en el metaboloma de una célula o tejido.
- En procesos con múltiples etapas tales como la glucólisis, ciertas reacciones están esencialmente en el equilibrio durante el estado estacionario; las velocidades de estas reacciones aumentan o disminuyen con la concentración de sustrato. Otras reacciones se encuentran lejos del equilibrio; estas reacciones son con frecuencia los puntos en los que se regula globalmente la ruta.
- Mecanismos reguladores mantienen niveles casi constantes de metabolitos clave tales como ATP y NADH en las células y la glucosa en la sangre, al tiempo que adaptan la utilización o producción de glucosa a las necesidades cambiantes del organismo.
- Los niveles de ATP y AMP son un reflejo sensible del estatus energético de una célula de modo que cuando disminuye la razón [ATP]/[AMP], la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) desencadena diversas respuestas celulares para aumentar [ATP] y disminuir [AMP].

15.2 Análisis del control metabólico

0Los estudios detallados de la regulación metabólica no eran factibles hasta que no se clarificaran los pasos químicos básicos de una ruta y se caracterizaran los enzimas responsables. Empezando con el descubrimiento por Eduard Buchner (alrededor de 1900) de que un extracto de células de levadura rotas podía convertir la glucosa en etanol y CO_2, uno de los esfuerzos principales de la investigación bioquímica fue deducir las etapas mediante las que tenía lugar esta transformación así como la purificación y caracterización de los enzimas que catalizan cada paso. A mitad del siglo XX se habían purificado y caracterizado los diez enzimas de la ruta glucolítica. En los siguientes 50 años se conocieron muchos detalles sobre la regulación de estos enzimas por señales intra y extracelulares, a través de los mecanismos alostéricos y covalentes descritos en este capítulo. La sabiduría convencional era que en una ruta lineal tal como la glucólisis, la catálisis por un enzima había de ser la más lenta y debía determinar, por tanto, la velocidad del flujo de metabolitos, o flujo, a través de la vía completa. En el caso de la glucólisis se consideraba que la PFK-1 era el enzima limitante de velocidad ya que se sabía que era regulado estrechamente por la fructosa 2,6-bisfosfato y otros efectores alostéricos.



Eduard Buchner, 1860–1917 [Fuente: Science Photo Library/Science Source.]

Con la llegada de la tecnología de la ingeniería genética fue posible probar esta hipótesis de "un único paso limitante de velocidad" al incrementar la concentración del enzima que cataliza el "paso limitante de velocidad" de la ruta y determinar si el flujo a través de la misma aumentaba de manera proporcional. En una mayoría de casos se vio que eso no era así: la explicación sencilla (un solo paso determinante de velocidad) era falsa. Está claro en la actualidad que en la mayoría de rutas el control del flujo se distribuye entre varios enzimas y que el grado con el que cada uno contribuye al control varía según las circunstancias metabólicas tales como suministro de material de partida (por ejemplo, glucosa), suministro de oxígeno, necesidad de otros productos procedentes de intermediarios de la ruta (por ejemplo, glucosa 6-fosfato para la ruta de las pentosas fosfato en la células que sintetizan grandes cantidades de nucleótidos), los efectos de metabolitos con función reguladora y el estatus hormonal del organismo (tales como los niveles de insulina y de glucagón), entre otros factores.

¿Por qué estamos interesados en qué es lo que limita el flujo a través de una ruta? Para comprender la acción de las hormonas o de los medicamentos, o la patología resultante de un fallo de la regulación metabólica hemos de saber donde se ejerce el control. Si los investigadores desean desarrollar un fármaco que estimula o inhibe una ruta, la diana lógica es el enzima que tiene un impacto mayor sobre aquella ruta. Por otro lado, la bioingeniería de un microorganismo para producir grandes cantidades de un producto de valor comercial requiere un conocimiento de lo que limita el flujo de metabolitos hacia tal producto.

Se puede medir experimentalmente la contribución de cada enzima al flujo a través de la ruta

Existen diversas maneras de determinar experimentalmente de qué forma un cambio en la actividad de un enzima de una ruta afecta el flujo de metabolitos a través de la misma. Consideremos los resultados experimentales que se muestran en la **Figura 15-9**. Cuando se homogenó una muestra de hígado de rata para liberar todos los enzimas solubles, el extracto llevó a cabo la conversión glucolítica de la glucosa en fructosa 1,6-bisfosfato a una velocidad que se podía medir. (Por cuestión de simplicidad este experimento se centró solamente en la primera parte de la ruta glucolítica). Cuando se añadieron cantidades crecientes de hexoquinasa IV (glucoquinasa) purificada al extracto, la velocidad de la glucólisis aumentó progresivamente. La adición de PFK-1 purificada al extracto también aumentó la velocidad de la glucólisis pero no de una forma tan espectacular como sucediera con la hexoquinasa. La adición de fosfohexosa isomerasa no tuvo ningún efecto. Estos resultados sugieren que tanto la hexoquinasa como la

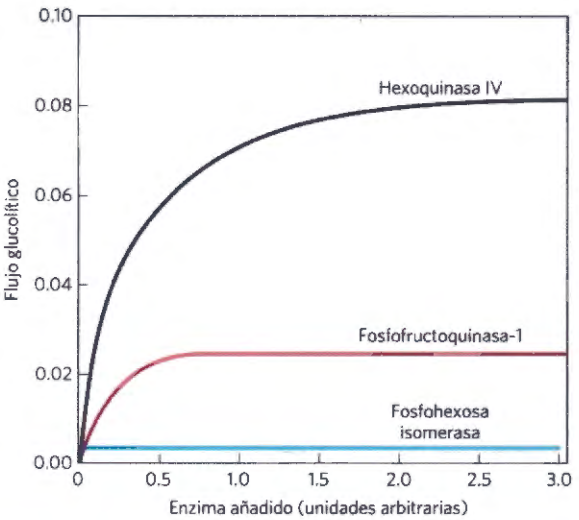


FIGURA 15-9 Dependencia del flujo glucolítico en un homogenado de hígado de rata tras la adición de enzimas. Se añadieron enzimas purificados en las cantidades que muestra el eje de abscisas a un extracto de hígado que llevaba a cabo la glucólisis in vitro. En el eje de ordenadas se muestra el aumento del flujo a través de la ruta.

PFK-1 contribuyen a establecer el flujo a través de la ruta (la hexoquinasa más que la PFK-1) mientras que la fosfohexosa isomerasa no contribuye al mismo.

Pueden realizarse experimentos similares con células u organismos intactos, utilizando inhibidores o activadores específicos para modificar la actividad de un enzima al tiempo que se observa el efecto sobre el flujo a través de la ruta. La cantidad de un enzima puede también alterarse genéticamente; la bioingeniería puede producir una célula que sintetiza copias extra del enzima que se está investigando o que tiene una versión menos activa del enzima que el enzima normal. El aumento de la concentración de un enzima mediante técnicas genéticas tiene a veces efectos significativos sobre el flujo aunque a veces no se observa ningún efecto.

Existen tres parámetros críticos que, conjuntamente, describen la capacidad de respuesta de una ruta a cambios en las circunstancias metabólicas y que son el núcleo del **análisis del control metabólico.** Daremos ahora una descripción cualitativa de estos parámetros y de su significado en el contexto de una célula viva. En el Recuadro 15-1 proporcionaremos una discusión cuantitativa más rigurosa.

El coeficiente de control de flujo cuantifica el efecto de un cambio en una actividad enzimática sobre el flujo metabólico a través de una ruta

Datos cuantitativos sobre el flujo metabólico, obtenidos de la forma descrita en la Figura 15-9 se pueden utilizar para calcular un **coeficiente de control de flujo, *C*,** para cada enzima de una ruta. Este coeficiente expresa la contribución relativa de cada enzima en el establecimiento de la velocidad a la que fluyen los metabolitos a través de la ruta, es decir, el **flujo, *J*.** *C* puede tener cualquier valor desde 0,0 (para un enzima sin impacto sobre el flujo), hasta 1,0 (para un enzima que determina completamente el flujo). Un enzima también puede tener un coeficiente de control de flujo *negativo*. En una ruta ramificada, un enzima de una rama, al drenar intermediarios fuera de la otra rama, puede tener un impacto negativo sobre el flujo a través de la otra rama **(Fig. 15-10)**. *C* no es una constante, y no es intrínseco para un único enzima; es una función de todo el sistema de enzimas y su valor depende de las concentraciones de sustratos y efectores.

Cuando se sometieron datos reales del experimento sobre la glucólisis en un extracto de hígado de rata (Fig. 15-9) a este tipo de análisis, se encontraron los siguientes coeficientes de control de flujo (para enzimas a las concentraciones presentes en el extracto): 0,79 para la hexoquinasa, 0,21 para la PFK-1 y 0,0 para la fosfohexosa isomerasa. No es una casualidad que la suma de estos valores sea 1,0; podemos demostrar que para cualquier ruta completa la suma de los coeficientes de control de flujo debe ser igual a la unidad.

El coeficiente de elasticidad está relacionado con la sensibilidad de un enzima a cambios en la concentración de metabolito o de regulador

Un segundo parámetro, el **coeficiente de elasticidad, ε,** expresa cuantitativamente la sensibilidad de un enzima a variaciones en la concentración de un metabolito o de un regulador; es una función de las propiedades cinéticas intrínsecas del enzima. Por ejemplo, un enzima con cinética de Michaelis-Menten típica muestra una respuesta hiperbólica al aumento en la concentración de sustrato **(Fig. 15-11)**. A bajas concentraciones de sustrato (por ej., 0,1 K_m) cada incremento en la concentración de sustrato da lugar a un aumento comparable en la actividad enzimática, dando un ε próximo a 1,0. A concentraciones de sustrato relativamente elevadas (por ej., 10 K_m), el incremento en la concentración de sustrato tiene poco efecto sobre la velocidad de reacción debido a que el enzima ya está saturado con sustrato. La elasticidad en este caso se aproxima a cero. Para los enzimas alostéricos que muestran cooperatividad positiva, ε puede ser superior a 1,0 si bien no puede superar el coeficiente de Hill que, normalmente, adopta valores entre 1,0 y 4,0.

El coeficiente de respuesta expresa el efecto de un controlador externo sobre el flujo a través de una ruta

También podemos deducir una expresión cuantitativa para el impacto relativo de un factor externo (tal como

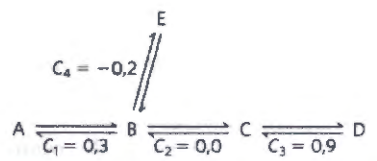


FIGURA 15-10 Coeficiente de control de flujo, *C*, en una ruta metabólica ramificada. En esta ruta sencilla, el intermediario B tiene dos destinos alternativos. En la medida que la reacción B⟶ E elimina B de la ruta A ⟶ D, controla esta ruta lo que da como resultado un coeficiente de control de flujo *negativo* para el enzima que cataliza el paso B⟶E. Observe que la suma de los cuatro coeficientes es igual a 1,0 tal como ha de ser.

RECUADRO 15-1 MÉTODOS Análisis del control metabólico: aspectos cuantitativos

Se pueden determinar cuantitativamente los factores que influyen en el paso de intermediarios (flujo) a través de una ruta mediante experimentos y expresarse en términos útiles para predecir el cambio en el flujo cuando cambia algún factor implicado en la ruta. Considere la secuencia sencilla de reacciones de la Figura 1, en la que un sustrato X, por ejemplo glucosa, se convierte en varios pasos en el producto Z (quizás el piruvato formado glucolíticamente). Un enzima posterior de la ruta es una deshidrogenasa (ydh) que actúa sobre el sustrato Y. Dado que es fácil medir la acción de una deshidrogenasa (véase la Fig. 13-24), podemos utilizar el flujo (J) a través de este paso (J_{ydh}) para medir el flujo a través de la totalidad de la ruta. Manipulamos experimentalmente la concentración de un enzima anterior de la ruta (xasa, que actúa sobre el sustrato X) y medimos el flujo a través de la ruta (J_{ydh}) para diversas concentraciones del enzima xasa.

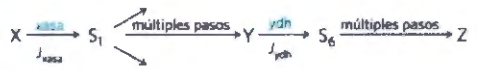


FIGURA 1 Flujo a través de una ruta hipotética con múltiples enzimas.

La relación entre el flujo a través de la ruta desde X a Z en la célula intacta y la concentración de cada enzima de la ruta debería ser hiperbólica, sin prácticamente flujo a una concentración infinitamente baja de enzima y flujo próximo al máximo a una actividad enzimática muy elevada. En una gráfica de J_{ydh} frente a la concentración de xasa, E_{xasa}, la variación de flujo con un pequeño cambio de enzima es $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$, la cual es simplemente la pendiente de la tangente a la curva a cualquier concentración del enzima, E_{xasa}, y que tiende a cero a E_{xasa} saturante. A baja E_{xasa} la pendiente es abrupta; el flujo aumenta con cada incremento de la actividad enzimática. A una E_{xasa} muy elevada la pendiente es mucho menor; el sistema es menos sensible a la xasa adicionada porque ya está presente en exceso sobre el resto de enzimas de la ruta.

Para mostrar cuantitativamente la dependencia del flujo a través de la ruta, ∂J_{ydh} respecto a ∂E_{xasa}, podríamos utilizar la razón $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$. Sin embargo, su utilidad es limitada ya que su valor depende de las unidades utilizadas para expresar el flujo y la actividad enzimática. Si expresamos las variaciones *fraccionales* en flujo y actividad enzimática, $\partial J_{ydh}/J_{ydh}$, y $\partial E_{xasa}/E_{xasa}$, obtenemos una expresión adimensional para el **coeficiente del control de flujo, C**, en este caso $C^{J_{ydh}}_{xasa}$:

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{J_{ydh}} \Big/ \frac{\partial E_{xasa}}{E_{xasa}} \qquad (1)$$

que se puede reordenar

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{\partial E_{xasa}} \cdot \frac{E_{xasa}}{J_{ydh}}$$

que es matemáticamente idéntica a

$$C^{J_{ydh}}_{xasa} \approx \frac{\partial \ln J_{ydh}}{\partial \ln E_{xasa}}$$

Esta ecuación sugiere una forma gráfica sencilla para determinar el coeficiente de control de flujo: $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ es la pendiente de la tangente en la gráfica de $\ln J_{ydh}$ frente a $\ln E_{xasa}$, que puede obtenerse al volver a representar los datos de la Figura 2a para obtener la Figura 2b. Observe que $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ no es una constante; depende de la E_{xasa} inicial a partir del cual tiene lugar el cambio en la concentración de enzima. Para los casos mostrados en la Figura 2, $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ se encuentra alrededor de 1,0 a la E_{xasa} más baja pero sólo alrededor de 0,2 a elevada E_{xasa}. Un valor de $C^{J_{ydh}}_{xasa}$ próximo a 1,0 significa que la concentración del enzima determina completamente el flujo a través de la ruta; un valor próximo a 0,0 significa que la concentración del enzima no limita el flujo a través de la ruta. A menos que el coeficiente de control de flujo sea superior a aproximadamente 0,5, las variaciones en la actividad del enzima no tendrán un efecto importante sobre el flujo.

La **elasticidad, ε,** de un enzima es una medida de cómo cambia la actividad catalítica de ese enzima cuando varía la concentración de un metabolito ya sea sustrato, producto o efector. Se obtiene a partir de una gráfica experimental de la velocidad de la reacción catalizada por el enzima frente a la concentración del metabolito a las concentraciones de metabolito que se encuentran en la célula. Mediante argumentos análo-

una hormona o factor de crecimiento) que no es ni un metabolito ni un enzima de la ruta, sobre el flujo a través de la ruta. El experimento mediría el flujo a través de la ruta (glucólisis en este caso) a varios niveles del parámetro P (por ejemplo, la concentración de insulina) para obtener el **coeficiente de respuesta, R,** que

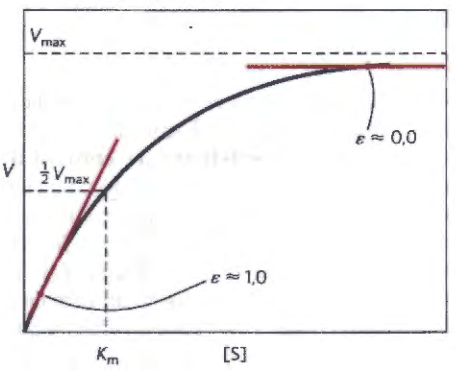


FIGURA 15-11 Coeficiente de elasticidad, ε, de un enzima con cinética de Michaelis-Menten típica. A concentraciones de sustrato muy por debajo de la K_m, cada incremento en la [S] produce un cambio correspondiente grande de la velocidad de reacción, V. Para esta región de la curva el enzima tiene un ε de alrededor de 1,0. A [S] >> K_m, el incremento de [S] tiene poco efecto sobre V; aquí ε es próximo a 0,0.

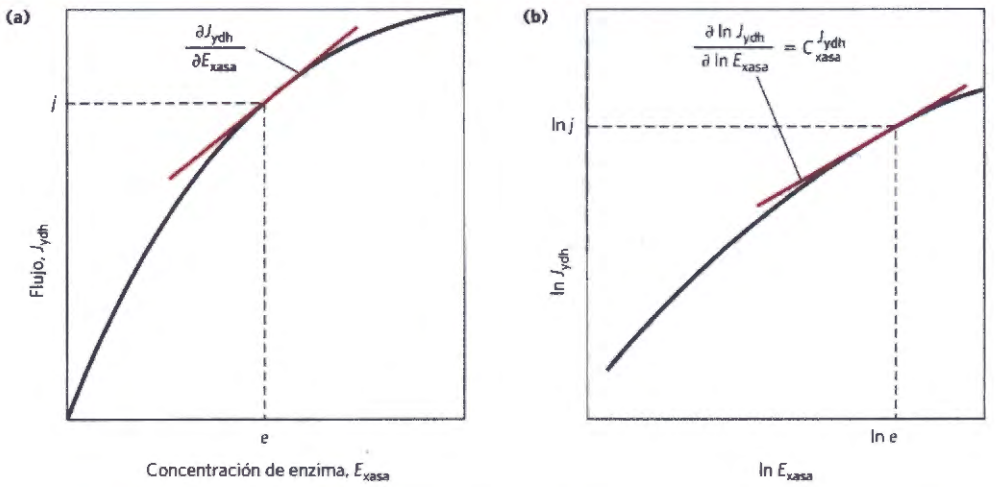


FIGURA 2 Coeficiente de control de flujo. **(a)** Variación típica del flujo de la ruta, J_{ydh}, medida en el paso catalizado por el enzima ydh, en función de la cantidad del enzima xasa, E_{xasa}, que cataliza una etapa anterior de la ruta. El coeficiente de control de flujo a $\langle e,j \rangle$ es el producto de la pendiente de la tangente a la curva, $\partial J_{ydh}/\partial E_{xasa}$, y la razón (factor de escalado), e/j. **(b)** En una gráfica bilogarítmica de la misma curva, el coeficiente de control de flujo es la pendiente de la tangente a la curva.

gos a los utilizados para obtener C, podemos demostrar que ε es la pendiente de la tangente en una gráfica de ln V frente ln [sustrato, o producto o efector]:

$$\varepsilon_S^{xasa} = \frac{\partial V_{xasa}}{\partial S} \cdot \frac{S}{V_{xasa}} = \frac{\partial \ln |V_{xasa}|}{\partial \ln S}$$

Para un enzima con cinética de Michaelis-Menten típica, el valor de ε va desde alrededor de 1 para concentraciones de sustrato muy por debajo de la K_m hasta cerca de 0 a medida que se aproxima a V_{max}. Los enzimas alostéricos pueden tener elasticidades superiores a 1,0 pero no superiores a su coeficiente de Hill.

Finalmente, el efecto de controladores fuera de la propia ruta (es decir, no metabolitos) se puede medir y expresar como **coeficiente de respuesta, *R*.** Se mide la variación en el flujo a través de la ruta cuando se hace variar la concentración del parámetro controlador P, y se define R de forma análoga a la de la Ecuación 1, lo que da la expresión

$$R_P^{J_{ydh}} = \frac{\partial J_{ydh}}{\partial P} \cdot \frac{P}{J_{ydh}}$$

Utilizando la misma lógica y métodos gráficos descritos antes para determinar C, podemos obtener R como pendiente de la tangente de la gráfica de ln J frente a ln P.

Los tres coeficientes que hemos descrito se relacionan de una forma sencilla:

$$R_P^{J_{ydh}} = C_{xasa}^{J_{ydh}} \cdot \varepsilon_P^{xasa}$$

Así, la sensibilidad de cada enzima de una ruta a una variación en un factor controlador externo es una función sencilla de dos cosas: el coeficiente de control, una variable que expresa el grado con el que el enzima influye en el flujo bajo un conjunto dado de condiciones, y la elasticidad, una propiedad intrínseca del enzima que refleja su sensibilidad a las concentraciones de sustrato y de efector.

COPY-STATION

expresa el cambio en el flujo de la ruta cuando cambia P ([insulina]).

Los tres coeficientes, C, ε y R están relacionados de una manera sencilla: la sensibilidad (R) de una ruta a un factor externo que afecta a un enzima determinado es función de (1) la sensibilidad de la ruta a cambios en la actividad de aquel enzima (el coeficiente de control, C) y (2) la sensibilidad de tal enzima específico a cambios en el factor de control externo (la elasticidad, ε):

$$R = C \cdot \varepsilon$$

Se puede examinar de esta manera cada enzima de la ruta y determinar separadamente los efectos de cualquiera de los factores externos sobre el flujo a través de la ruta. Así, en principio, podemos predecir de qué modo variará el flujo de sustrato a través de una serie de pasos enzimáticos cuando se produce un cambio en uno o más factores de control fuera de la ruta. En el Recuadro 15-1 se muestra el tratamiento cuantitativo de estos conceptos cualitativos.

El análisis del control metabólico se ha aplicado al metabolismo glucídico con resultados sorprendentes

El análisis del control metabólico proporciona un marco dentro del cual podemos pensar cuantitativamente acer-

ca de la regulación, interpretar el significado de las propiedades reguladoras de cada enzima de una ruta, identificar los pasos que más afectan al flujo a través de la ruta y distinguir entre mecanismos *reguladores* que actúan para mantener la concentración de los metabolitos y mecanismos de *control* que, de hecho, alteran el flujo a través de la ruta. Por ejemplo, el análisis de la ruta glucolítica en la levadura, ha revelado la existencia de un coeficiente de control de flujo inesperadamente bajo para la PFK-1, la cual, como ya hemos comentado, había sido considerada como el principal punto de control, el "paso limitante de velocidad", de la glucólisis. La elevación experimental de la concentración de PFK-1 en un factor de cinco condujo a un cambio en el flujo a través de la glucólisis de menos del 10%, lo que sugirió que el papel real de la regulación por la PFK-1 no es controlar el flujo a través de la glucólisis sino intervenir en la homeostasis de metabolitos con el fin de impedir grandes cambios en las concentraciones de metabolitos cuando el flujo a través de la glucólisis aumenta como respuesta a elevadas concentraciones de glucosa o insulina en la sangre. Recuérdese que el estudio de la glucólisis en un extracto de hígado (Fig. 15-9) también proporcionó un coeficiente de control de flujo que contradecía el conocimiento convencional; mostró que la hexoquinasa, no la PFK-1, tenía más influencia en el establecimiento del flujo a través de la glucólisis. Hemos de indicar aquí que un extracto de hígado está muy lejos de ser el equivalente de un hepatocito; la forma ideal de estudiar el control de flujo es manipulando un solo enzima cada vez en la célula viva. Esto ya es factible en muchos casos.

Se ha utilizado la resonancia magnética nucledar (RMN) como método no invasivo para determinar la concentración de glucógeno y metabolitos en la ruta de cinco pasos que va de la glucosa en la sangre al glucógeno en los miocitos **(Fig. 15-12)** de músculo humano y de rata. Se encontró que el coeficiente de control de flujo para la glucógeno sintasa era menor que los de los pasos catalizados tanto por el transportador de glucosa como por la hexoquinasa. (La glucógeno sintasa y otros enzimas del metabolismo del glucógeno se discuten en las Secciones 15.4 15.5) Este hallazgo contradice la idea aceptada convencionalmente de que la glucógeno sintasa es el sitio de control del flujo y sugiere que la importancia de la fosforilación /desfosforilación de la glucógeno sintasa está, contrariamente, relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de metabolitos, es decir, *regulación* y no *control*. Dos metabolitos de esta ruta, glucosa y glucosa 6-fosfato, son intermediarios clave de otras rutas, entre ellas la glucólisis, ruta de las pentosas fosfato y síntesis de glucosamina. El análisis del control metabólico sugiere que cuando aumenta la concentración de glucosa en la sangre, la insulina actúa sobre el músculo para (1) aumentar el transporte de glucosa a las células incorporando GLUT4 a la membrana plasmática, (2) inducir la síntesis de hexoquinasa y (3) activar la glucógeno sintasa por alteración covalente (véase la Fig. 15-41). Los dos primeros efectos de la insulina aumentan el flujo de glucosa a través de la ruta (control) y el tercero sirve para adaptar la actividad de la glucógeno sintasa de modo que las concentraciones de metabolitos (glucosa 6-fosfato, por ej.) no cambien de manera espectacular con el aumento de flujo (regulación).

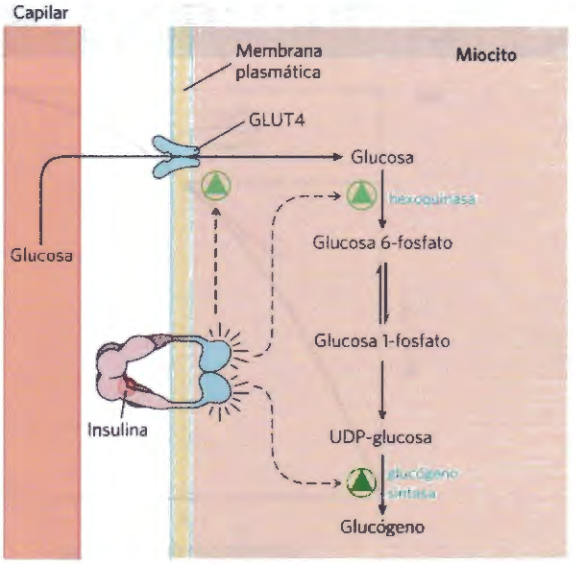


FIGURA 15-12 Control de la síntesis de glucógeno en el músculo por la glucosa sanguínea. La insulina tiene un efecto sobre tres de los cinco pasos de esta ruta pero son los efectos sobre el transporte y la actividad hexoquinasa, no el cambio en la actividad glucógeno sintasa, lo que hacen aumentar el flujo hacia el glucógeno.

El análisis del control metabólico sugiere un método general para incrementar el flujo a través de una ruta

¿Cómo se podría modificar una célula para incrementar el flujo a través de una ruta sin alterar la concentración de otros metabolitos o los flujos a través de otras rutas? Hace más de tres décadas que Henrik Kacser predijo, sobre la base del análisis del control metabólico, que esto se podría conseguir incrementando las concentraciones de todos los enzimas de la ruta. La predicción se ha confirmado en diversas pruebas experimentales a la vez que también coincide con la forma en la que, normalmente, las células controlan flujos a través de una ruta. Por ejemplo, cuando se suministra a las ratas una dieta de alto contenido proteico, eliminan el exceso de grupos amino convirtiéndolos en urea en el ciclo de la urea (Capítulo 18). Después de tal modificación en la dieta, la eliminación de urea aumenta cuatro veces y la cantidad de los ocho enzimas del ciclo de la urea aumenta de dos a tres veces. De modo parecido cuando se desencadena un aumento de la oxidación de ácidos grasos por el receptor γ de los peroxisomas activado por proliferador (PPARγ, un factor de transcripción activado por ligando; véase la Fig. 21-22), se aumenta la síntesis del *conjunto completo* de enzimas oxidativos de los ácidos grasos. Con la utilización cada vez más frecuente de microchips de DNA para estudiar la expresión de conjuntos completos de genes en respuesta a diversas perturbaciones, deberíamos poder saber en un futuro próximo si éste es el mecanismo general mediante el que las células realizan ajustes a largo plazo en los flujos a través de rutas específicas.

COPY-STATION

RESUMEN 15.2 Análisis del control metabólico

■ El análisis del control metabólico demuestra que el control de la velocidad de flujo de metabolitos a través de una ruta se distribuye entre varios enzimas de la ruta.

- El coeficiente de control de flujo, C, es una medida obtenida experimentalmente del efecto de la concentración de un enzima sobre el flujo a través de una ruta multienzimática. Es característico del sistema completo y no intrínseco del enzima.
- El coeficiente de elasticidad, ε, de un enzima es un valor obtenido experimentalmente sobre su sensibilidad a cambios en la concentración de un metabolito o de una molécula reguladora.
- El coeficiente de respuesta, R, es la expresión del cambio del flujo a través de una ruta, determinado experimentalmente, en respuesta a una hormona o un segundo mensajero reguladores. Es función de C y ε: $R = C \cdot \varepsilon$.
- Algunos enzimas regulados controlan el flujo a través de una ruta, mientras que otros reequilibran la concentración de metabolitos en respuesta a un cambio en el flujo. La primera actividad es el *control*; la segunda, la actividad reequilibradora, es la *regulación*.
- El análisis del control metabólico predice, y los experimentos lo han confirmado, que la manera más efectiva para incrementar el flujo hacia un producto específico es aumentar la concentración de todos los enzimas de la ruta.

15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis

En los mamíferos la **gluconeogénesis**, tiene lugar principalmente en el hígado y su misión es proporcionar glucosa para exportarla a otros tejidos cuando se han agotado los depósitos de glucógeno y cuando no se encuentra disponible la glucosa de la dieta. Tal como se discutió en el Capítulo 14 la gluconeogénesis utiliza varios de los enzimas que actúan en la glucólisis, pero no es simplemente la inversa de la glucólisis. Siete de las reacciones glucolíticas son reversibles y los enzimas que catalizan estas reacciones también funcionan en la gluconeogénesis **(Fig. 15-13)**. Tres reacciones de la glucólisis son tan exergónicas que son prácticamente irreversibles: las catalizadas por la hexoquinasa, por la PFK-1 y por la piruvato quinasa. Las tres reacciones presentan una $\Delta G'$ grande y negativa (la Tabla 15-3 muestra los valores en el músculo cardíaco). En la gluconeogénesis se utilizan rodeos para cada uno de estos pasos irreversibles; por ejemplo, la conversión de fructosa 1,6 bisfosfato en fructosa-6-fosfato está catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). Cada una de estas reacciones de rodeo tiene también una ΔG negativa y grande.

En cada uno de los tres pasos en los que las reacciones glucolíticas están rodeadas por reacciones gluconeogénicas alternativas, la operación simultánea de ambas rutas consumiría ATP sin que se consiguiese ningún trabajo químico o biológico. Por ejemplo, la PFK-1 y la FBPasa-1 catalizan las reacciones opuestas

$$\text{ATP} + \text{fructosa 6-fosfato} \xrightarrow{\text{PFK-1}} \text{ADP} + \text{fructosa 1,6-bisfosfato}$$

$$\text{Fructosa 1,6-bisfosfato} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{FBPasa-1}} \text{fructosa 6-fosfato} + \text{P}_\text{i}$$

La suma de las dos reacciones es

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_\text{i} + \text{calor}$$

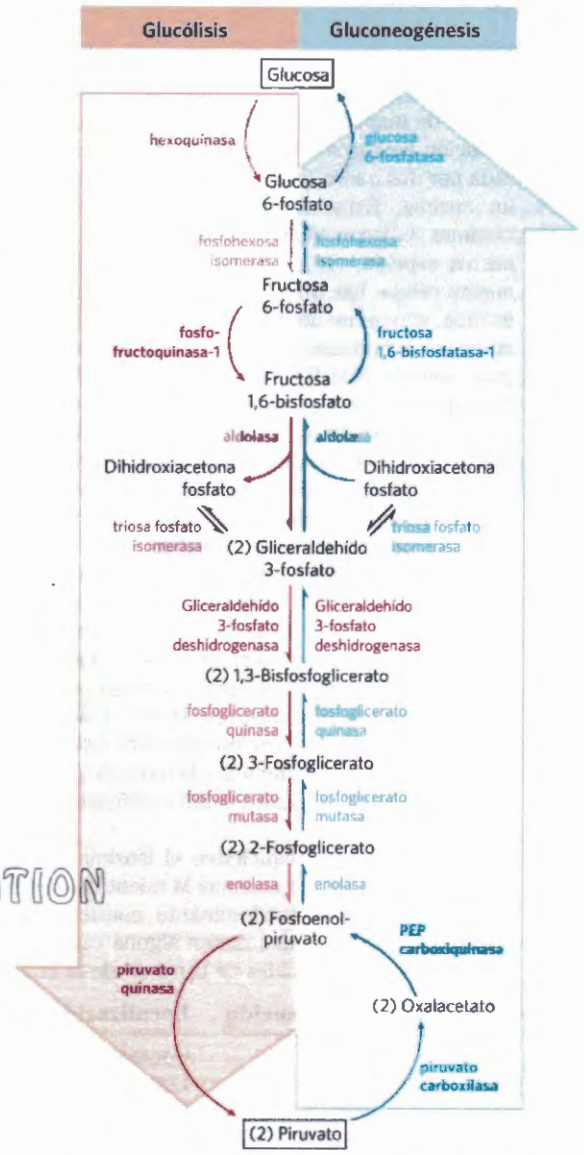


FIGURA 15-13 Glucólisis y gluconeogénesis. Rutas opuestas de la glucólisis (rosa) y gluconeogénesis (azul) en el hígado de rata. Tres pasos están catalizados por enzimas diferentes en la gluconeogénesis (las "reacciones de rodeo") y en la glucólisis; siete pasos están catalizados por los mismos enzimas en las dos vías. Se han omitido los cofactores por razones de claridad.

esto es, hidrólisis de ATP sin que se produzca ningún trabajo metabólico útil. Está claro que si se permitiese que estas dos reacciones tuviesen lugar de manera simultánea a una velocidad elevada en la misma célula, se disiparía una gran cantidad de energía en forma de calor. Este proceso tan poco económico se ha denominado **ciclo inútil**. Sin embargo, tal como veremos más adelante, tales ciclos pueden proporcionar ventajas para controlar rutas con lo que el término **ciclo del sustrato** constituye una descripción mejor. Ciclos de sustrato similares también tienen lugar con los dos restantes conjuntos de reacciones de rodeo de la gluconeogénesis (Fig. 15-13)

Analizamos ahora con cierto detalle los mecanismos que regulan la glucólisis y la gluconeogénesis en los tres puntos en los que las rutas son diferentes.

BOX 15-2 Isozimas: proteínas diferentes que catalizan la misma reacción

Las cuatro formas de la hexoquinasa encontradas en tejidos de mamíferos no son sino un ejemplo de una situación biológica común: la misma reacción catalizada por dos o más formas moleculares diferentes de un enzima. Estas formas múltiples, denominadas isozimas o isoenzimas, pueden presentarse en la misma especie, en el mismo tejido o incluso en la misma célula. Las diferentes formas (isoformas) del enzima generalmente difieren en sus propiedades cinéticas o reguladoras, en el cofactor que utilizan (por ejemplo, NADH o NADPH en los isozimas de las deshidrogenasas) o en su distribución subcelular (solubles o ligados a membrana). Los isozimas pueden tener secuencias de aminoácidos similares, pero no idénticas, y, en muchos casos, comparten claramente un origen evolutivo común.

Uno de los primeros enzimas de los que se encontró que tenían isozimas fue la lactato deshidrogenasa (LDH; p. 553) la cual, en tejidos de vertebrados, existe en al menos cinco isozimas diferentes que se pueden separar por electroforesis. Todos los isozimas de la LDH contienen cuatro cadenas polipeptídicas (cada una de ellas con una M_r de 33.500) y cada tipo contiene una proporción diferente de dos clases de polipéptidos. La cadena M (de músculo) y la cadena H (de "heart", corazón) están codificadas por dos genes diferentes.

En el músculo esquelético el isozima predominante contiene cuatro cadenas M mientras que en el corazón el isozima predominante contiene cuatro cadenas H. Otros tejidos tienen alguna combinación de los cinco tipos posibles de isozimas de la LDH:

Tipo	Composición	Localización
LDH_1	HHHH	Corazón y eritrocito
LDH_2	HHHM	Corazón y eritrocito
LDH_3	HHMM	Cerebro y riñón
LDH_4	HMMM	Músculo esquelético e hígado
LDH_5	MMMM	Músculo esquelético e hígado

Las diferencias en el contenido de isozimas de los tejidos pueden utilizarse para evaluar el momento y extensión de una lesión cardíaca debida a un infarto de miocardio (ataque de corazón). La lesión de los tejidos cardíacos da lugar a la liberación de LDH del corazón a la sangre. Poco después de un ataque de corazón, la concentración total de LDH sanguínea aumenta habiendo más LDH_2 que LDH_1. Después de 12 horas las cantidades de LDH_1 y LDH_2 son muy similares y después de 24 horas hay más LDH_1 que LDH_2. Este cambio en la proporción LDH_1/LDH_2, junto con el aumento en sangre de otro enzima, la creatina quinasa, son prueba muy importante de la existencia de un infarto de miocardio reciente. ■

Los diferentes isozimas de la LDH tienen valores significativamente diferentes de V_{max} y K_m, especialmente respecto al piruvato. Las propiedades de la LDH_4 favorecen la reducción rápida a lactato de concentraciones muy bajas de piruvato en el músculo esquelético, mientras que las del isozima LDH_1 favorecen la rápida oxidación del lactato a piruvato en el corazón.

En general, la distribución de los diferentes isozimas de un enzima determinado refleja al menos cuatro factores:

1. *Diferentes patrones metabólicos en órganos diferentes.* En el caso de la glucógeno fosforilasa, los isozimas del músculo esquelético y del hígado tienen diferentes propiedades reguladoras, lo que es reflejo de los diferentes papeles de la degradación del glucógeno en estos dos tejidos.
2. *Diferentes localizaciones y papeles metabólicos de los isozimas de la misma célula.* Un ejemplo de esto son los isozimas de la citrato deshidrogenasa del citosol y de la mitocondria (Capítulo 16).
3. *Diferentes etapas del desarrollo en tejidos embrionarios o fetales y en los tejidos adultos.* Por ejemplo, el hígado fetal tiene una distribución característica de los isozimas de la LDH que cambia cuando el órgano se desarrolla a su forma adulta. Algunos enzimas del catabolismo de la glucosa en células malignas (cancerosas) se presentan en su forma isozimática fetal y no la adulta.
4. *Diferentes respuestas de isozimas a moduladores alostéricos.* Esta diferencia es útil en el ajuste fino de las velocidades metabólicas. La hexoquinasa IV (glucoquinasa) del hígado y los isozimas de la hexoquinasa de otros tejidos difieren en su sensibilidad a la inhibición por glucosa 6-fosfato.

Copy-station

Los isozimas de la hexoquinasa de músculo y de hígado están afectados de forma diferente por su producto, la glucosa 6-fosfato

La hexoquinasa, que cataliza la entrada de glucosa a la ruta glucolítica, es un enzima regulador. En los humanos existen cuatro isozimas (designados I a IV) codificados por cuatro genes diferentes. Los **isozimas** son proteínas diferentes que catalizan la misma reacción (Recuadro 15-2). El isozima predominante de la hexoquinasa de los miocitos (**hexoquinasa II**) tiene una elevada afinidad por la glucosa (está semisaturada a 0,1 mM aproximadamente). Debido a que la glucosa que entra en los miocitos proveniente de la sangre (en la que la concentración de glucosa es de 4 a 5 mM) produce una concentración intracelular de glucosa suficientemente elevada para saturar la hexoquinasa II, el enzima actúa normalmente a su velocidad máxima o casi. La **hexoquinasas I** y la hexoquinasa II musculares son inhibidas alostéricamente por su producto, glucosa

6-fosfato, por lo que siempre que la concentración de glucosa 6-fosfato celular se eleva por encima de su nivel normal estos isozimas son inhibidos temporal y reversiblemente, equilibrando la velocidad de formación de glucosa 6-fosfato con la velocidad de su utilización y restableciendo el estado estacionario.

Los diferentes isozimas de la hexoquinasa de hígado y músculo reflejan el papel diferente de estos órganos en el metabolismo de los glúcidos: el músculo consume glucosa, utilizándola para la producción de energía, mientras que el hígado mantiene la homeostasis de la glucosa eliminando o produciendo glucosa según sea la concentración de glucosa en la sangre. El isozima de la hexoquinasa predominante en el hígado es la **hexoquinasa IV**, (glucoquinasa), que difiere en tres aspectos importantes de las hexoquinasas I a III musculares. En primer lugar, la concentración de glucosa a la que la hexoquinasa IV está semisaturada (alrededor de 10 mM) es superior a la concentración usual de glucosa en la sangre. Gracias a que un eficiente transportador de glucosa en los hepatocitos (**GLUT2**) equilibra rápidamente las concentraciones de glucosa en el citosol y en la sangre (véase la Fig. 11-28 para la cinética del mismo transportador, GLUT2, en los eritrocitos), la elevada K_m de la hexoquinasa IV permite su regulación directa por el nivel de glucosa sanguínea **(Fig. 15-14)**. Cuando la concentración de glucosa en la sangre es alta, tal como sucede después de una comida rica en glúcidos, la glucosa sanguínea en exceso es transportada a los hepatocitos en donde la hexoquinasa IV la convierte en glucosa 6-fosfato. Dado que la hexoquinasa IV no está saturada a 10 mM de glucosa, su actividad continúa aumentando a medida que la concentración de glucosa sube hasta 10 mM o más. En condiciones de glucosa sanguínea baja, la concentración de glucosa en un hepatocito es baja en relación a la K_m de la hexoquinasa IV por lo que la glucosa generada por la gluconeogénesis abandona la célula antes de ser atrapada por fosforilación

Segundo, la hexoquinasa IV no es inhibida por la glucosa 6-fosfato por lo que puede, así, continuar operando cuando la acumulación de glucosa 6-fosfato inhibe completamente las hexoquinasas I a III. Finalmente, la hexoquinasa IV está sujeta a inhibición por la unión reversible de una proteína reguladora específica del hígado **(Fig. 15-15)**. La unión es mucho más fuerte en presencia del efector alostérico fructosa 6-fosfato. La glucosa compite con la fructosa 6-fosfato por unirse al enzima y produce la disociación de la proteína reguladora de la hexoquinasa IV, con la eliminación consiguiente

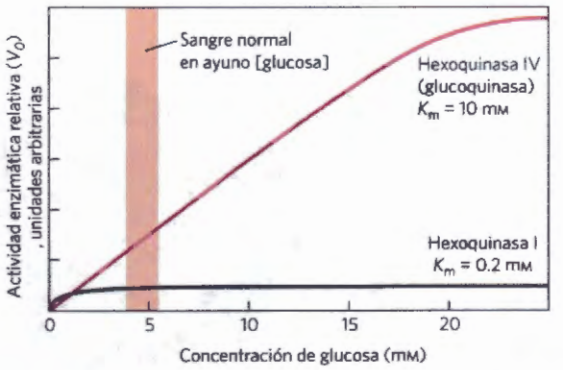


FIGURA 15-14 Comparación de las propiedades cinéticas de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) y la hexoquinasa I. Observe la sigmoidicidad de la hexoquinasa IV y la K_m mucho más baja de la hexoquinasa I. Cuando la glucosa sanguínea se eleva por encima de 5 mM, aumenta la actividad de la hexoquinasa IV, pero la hexoquinasa I ya está funcionando cerca de V_{max} por lo que no puede responder a un aumento en la concentración de glucosa. Las hexoquinasas I, II y III tienen propiedades cinéticas parecidas.

de la inhibición. Inmediatamente después de una comida rica en glúcidos, cuando la glucosa sanguínea es elevada, la glucosa entra en el hepatocito a través de GLUT2 y activa la hexoquinasa IV mediante este mecanismo. Durante un ayuno, cuando la glucosa sanguínea desciende por debajo de 5 mM, la fructosa 6-fosfato desencadena la inhibición de la hexoquinasa IV por la proteína reguladora, de modo que el hígado no compite con otros órganos por la escasa glucosa. Es interesante el mecanismo de inhibición por la proteína reguladora: la proteína ancla la hexoquinasa IV dentro del núcleo en donde queda segregada de otros enzimas de la glucólisis en el citosol (Fig. 15-15). Cuando aumenta la concentración de glucosa en el citosol, se equilibra con la glucosa del núcleo por transporte a través de poros nucleares. La glucosa produce la disociación de la proteína reguladora y la hexoquinasa IV entra en el citosol y empieza a fosforilar la glucosa.

La hexoquinasa IV (glucoquinasa) y la fructosa 6-fosfatasa están reguladas a nivel de transcripción

La hexoquinasa IV también está regulada a nivel de la síntesis de proteínas. Las circunstancias que exigen una mayor producción de energía (baja [ATP], alta [AMP], contracción muscular vigorosa) o un mayor consumo de glucosa (elevada glucosa sanguínea, por ejemplo) pro-

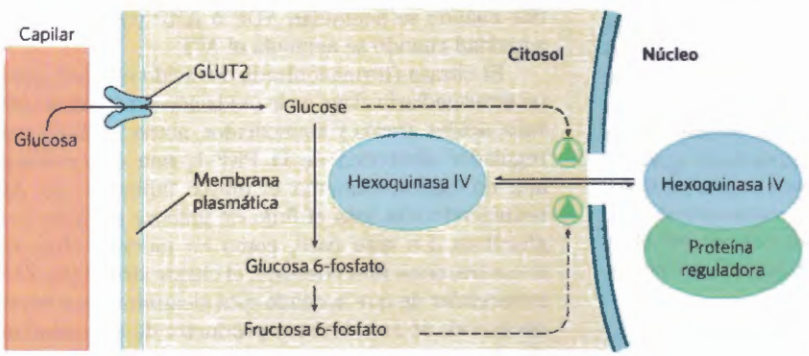
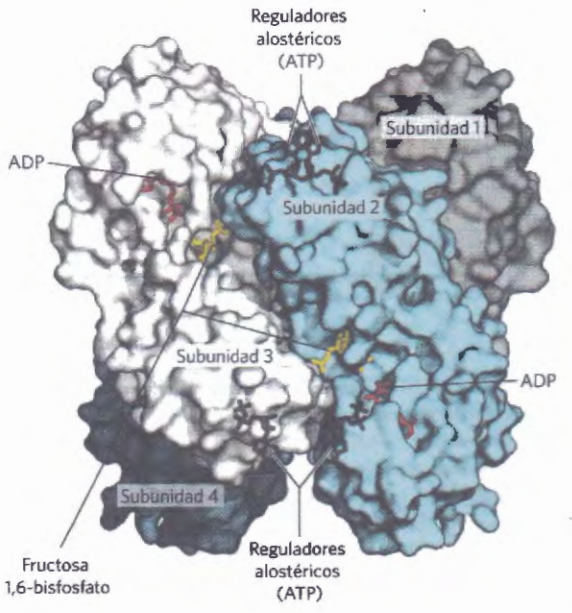
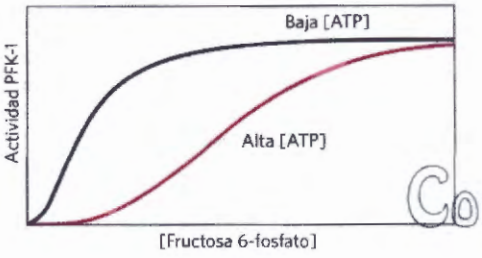


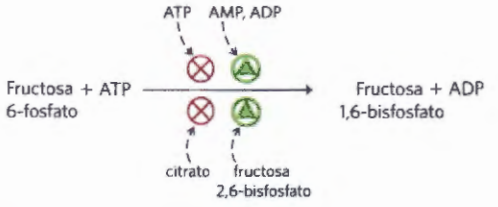
FIGURA 15-15 Regulación de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) mediante secuestro en el núcleo. El inhibidor proteico de la hexoquinasa IV es una proteína de unión nuclear que arrastra la hexoquinasa IV al núcleo cuando la concentración de fructosa 6-fosfato en el hígado es elevada y la libera al citosol cuando la concentración de glucosa es alta.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 15-16 Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y su regulación. **(a)** Diagrama de contorno superficial de la PFK-1 de *E. coli*, que muestra porciones de sus cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad tiene su propio sitio catalítico donde los productos ADP y fructosa 1,6-bisfosfato (rojo y amarillo, respectivamente en modelo de varillas) están casi en contacto, y sus propios sitios de fijación del regulador alostérico ATP (azul), sepultados en la proteína en las posiciones indicadas. **(b)** Regulación alostérica de la PFK-1 de músculo por el ATP mostrada mediante una curva de actividad en función de sustrato. A baja [ATP], la $K_{0.5}$ para la fructosa 6-fosfato es relativamente baja, lo que permite que el enzima funcione a una velocidad elevada a [fructosa 6-fosfato] relativamente baja. (Recuerde del Capítulo 6 que $K_{0.5}$ es el término correspondiente a K_m para los enzimas reguladores). Cuando [ATP] es alta, la $K_{0.5}$ para la fructosa 6-fosfato aumenta mucho tal como queda indicado por la relación sigmoidea entre concentración de sustrato y actividad enzimática. **(c)** Resumen de los reguladores que afectan a la actividad PFK-1. [Fuente: (a) PDB ID 1PFK. Y. Shirakihara y P. R. Evans. *J. Mol. Biol.* 204:973, 1988].

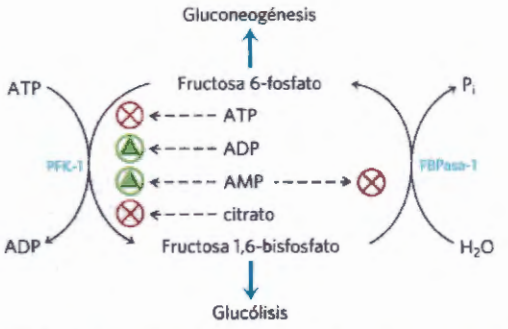


FIGURA 15-17 Regulación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1). En las siguientes figuras se detalla el importante papel de la fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación de este ciclo de sustrato.

vocan un aumento de la transcripción del gen de la hexoquinasa IV. La glucosa 6-fosfatasa, el enzima gluconeogénico que rodea el paso de la hexoquinasa en la glucólisis, está regulado a nivel de la transcripción por factores que exigen mayor producción de glucosa (baja glucosa sanguínea, señalización por glucagón). La regulación de la transcripción de estos dos enzimas (junto con otros enzimas de la glucólisis y de la gluconeogénesis) se describe a continuación.

La fosfofructoquinasa-1 y la fructosa 1,6-bisfosfatasa se regulan recíprocamente

Copyright

Tal como se ha dicho la glucosa 6-fosfato puede fluir hacia la glucólisis o hacia cualquiera de otras rutas diferentes entre las que se cuentan la síntesis de glucógeno y la ruta de las pentosas fosfato. La reacción metabólicamente irreversible catalizada por la PFK-1 es la etapa que compromete el paso de la glucosa a través de la glucólisis. Además de sitios de fijación para sus sustratos, este enzima complejo tiene varios sitios reguladores en los que se fijan activadores o inhibidores alostéricos.

El ATP no es sólo sustrato de la PFK-1 sino también uno de los productos finales de la ruta glucolítica. Cuando la elevada [ATP] celular señala que se está produciendo ATP más rápidamente de lo que se consume, el ATP inhibe la PFK-1 al fijarse a un sitio alostérico y disminuir la afinidad del enzima por su sustrato, la fructosa 6-fosfato **(Fig. 15-16)**. El ADP y el AMP, que aumentan su concentración cuando el consumo de ATP es superior a su producción, actúan alostéricamente para aliviar esta inhibición por el ATP. Estos efectos se combinan para producir una actividad enzimática superior cuando se acumulan ADP o AMP y disminuyen la actividad cuando se acumula el ATP.

El citrato (forma ionizada del ácido cítrico), que es un intermediario clave en la oxidación aeróbica del piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, actúa también como regulador alostérico de la PKF-1; una concentración alta de citrato aumenta el efecto inhibidor del ATP, reduciendo aún más el flujo de glucosa a través de la glucólisis. En este caso, como en muchos otros que encontraremos más adelante, el citrato sirve como señal intracelular de que la célula está alcanzando sus niveles necesarios de metabolismo productor de energía al oxidar grasas y proteínas.

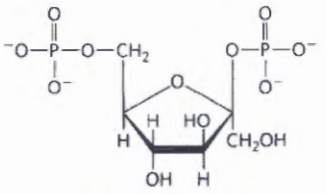
El paso correspondiente de la gluconeogénesis es la conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato **(Fig. 15-17)**. El enzima que cataliza esta reacción, la FBPasa-1, es fuertemente inhibido (alostéricamente) por el AMP; cuando el suministro celular de ATP es bajo (correspondiente a una elevada [AMP]), la síntesis de glucosa que requiere ATP se hace más lenta.

De este modo, estos pasos opuestos en las rutas glucolítica y gluconeogénica, los catalizados por PFK-1 y PBPasa-1, se regulan de manera coordinada y recíproca. En general, cuando se encuentran presentes concentraciones suficientes de acetil-CoA o citrato (el producto de la condensación del acetil-CoA con el oxalacetato), o cuando una alta proporción del adenilato celular está en forma de ATP, se favorece la gluconeogénesis. Cuando aumenta el nivel de AMP, se promueve la glucólisis por estimulación de la PFK-1 (y, tal como veremos en la Sección 15.5, promueve la degradación del glucógeno por activación de la glucógeno fosforilasa).

La fructosa 2,6-bisfosfato es un regulador alostérico potente de la PFK-1 y de la FBPasa-1

El papel especial del hígado en el mantenimiento de un nivel constante de glucosa sanguínea requiere mecanismos reguladores adicionales para coordinar la producción y el consumo de glucosa. Cuando descienden los niveles sanguíneos de glucosa la hormona **glucagón** indica al hígado que produzca y libere más glucosa y que deje de consumirla para sus propias necesidades. Una fuente de glucosa es el glucógeno almacenado en el hígado; otra fuente es la gluconeogénesis que utiliza piruvato, lactato, glicerol o ciertos aminoácidos como material de partida. Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, la insulina señala al hígado que utilice glucosa como combustible y como precursor para la síntesis y almacenamiento de glucógeno y triacilglicerol.

La rápida regulación hormonal de la glucólisis y de la gluconeogénesis está mediada por **la fructosa-2,6-bisfosfato**, un efector alostérico de los enzimas PFK-1 y FBPasa-1:



Fructosa 2,6-bisfosfato

Cuando la fructosa 2,6-bisfosfato se fija a su sitio alostérico sobre la PFK-1, aumenta la afinidad de este enzima hacia su sustrato fructosa-6-fosfato y reduce su afinidad hacia los inhibidores alostéricos ATP y citrato **(Fig. 15-18)**. A las concentraciones fisiológicas de sus sustratos, ATP y fructosa 6-fosfato, así como de los restantes efectores positivos y negativos (ATP, AMP, citrato), la PFK-1 es virtualmente inactiva en ausencia de fructosa 2,6-bisfosfato. La fructosa-2,6-bisfosfato tiene el efecto opuesto sobre la FBPasa-1; reduce su

COPY-STATION

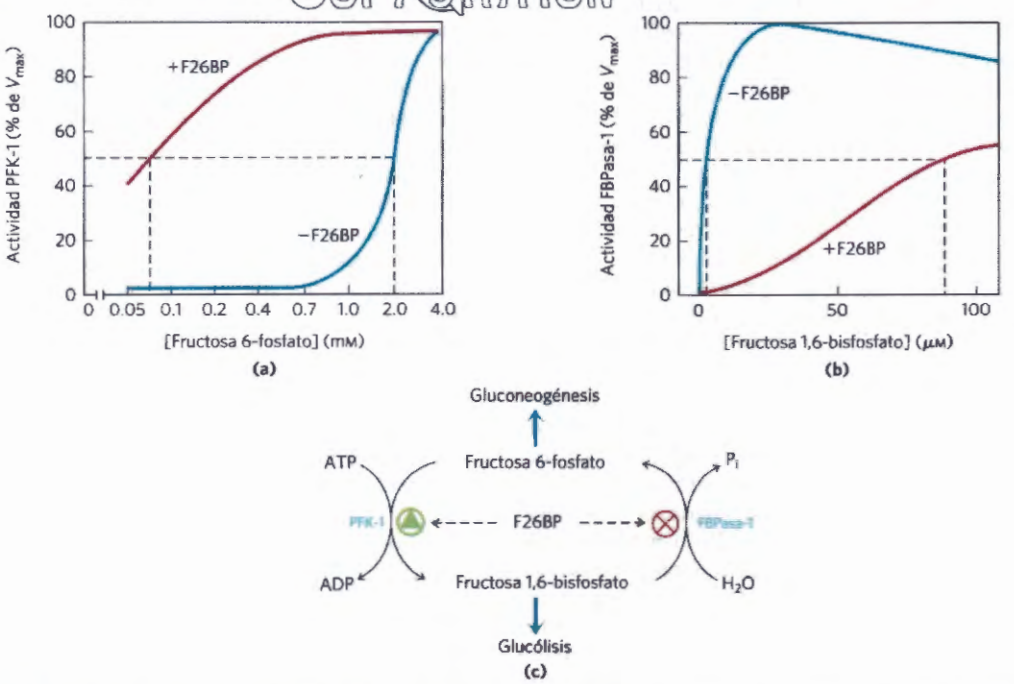


FIGURA 15-18 Papel de la fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis. La fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) tiene efectos opuestos sobre las actividades enzimáticas de la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1, un enzima glucolítico) y la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1, un enzima gluconeogénico). **(a)** La actividad PFK-1 en ausencia de F26BP (curva azul) es mitad de la máxima cuando la concentración de fructosa 6-fosfato es 2 mM (esto es, $K_{0.5}$ = 2 mM). Cuando está presente 0,13 ×M de F26BP (curva roja), la $K_{0.5}$ para la fructosa 6-fosfato es de sólo 0,08 mM. Así F26BP activa la PFK-1 aumentando su afinidad aparente por la fructosa 6-fosfato (Fig. 15-16b). **(b)** La actividad FBPasa-1 es inhibida por F26BP tan solo a 1 μM y es fuertemente inhibida a 25 μM. En ausencia de este inhibidor (curva azul) la $K_{0.5}$ para la fructosa 1,6-bisfosfato es 5 μM, pero en presencia de F26BP 25μM (curva roja) la $K_{0.5}$ es >70μM. La fructosa 2,6-bisfosfato también hace que la FBPasa-1 sea más sensible a la inhibición por otro regulador alostérico, el AMP. **(c)** Resumen de la regulación por la F26BP.

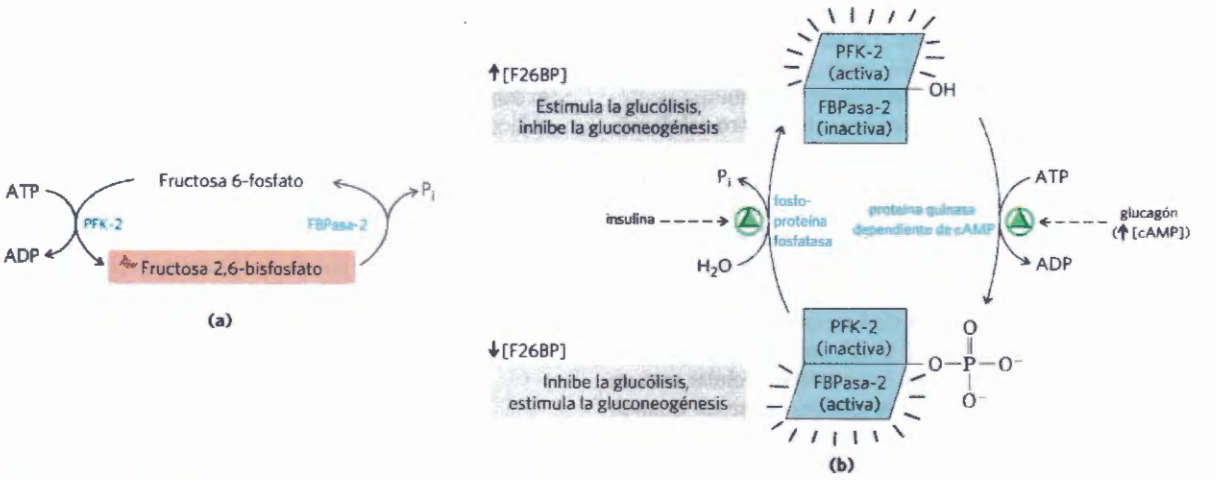


FIGURA 15-19 Regulación de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato. (a) La concentración celular del regulador fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP) viene determinada por las velocidades de su síntesis por la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) y su degradación por la fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2). **(b)** Ambas actividades enzimáticas forman parte de la misma cadena polipeptídica y ambas están reguladas, de manera recíproca, por la insulina y el glucagón.

afinidad por sus sustrato (Fig. 15-18b) reduciendo, así, la gluconeogénesis.

La concentración celular del regulador alostérico fructosa 2,6-bisfosfato viene dictada por las velocidades relativas de su formación y degradación **(Fig. 15-19a)**. Se forma por fosforilación de la fructosa 6-fosfato, catalizada por la **fosfoructoquinasa-2 (PFK-2)** y es degradada por la **fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2)**. (Obsérvese que estos enzimas son distintos de la PFK-1 y FBPasa-1 que catalizan la formación y rotura, respectivamente, de la fructosa 1,6-bisfosfato). PFK-2 y FBPasa-2 son dos actividades enzimáticas distintas que forman parte de una sola proteína bifuncional. El equilibrio de estas dos actividades en el hígado que determina el nivel celular de fructosa 2,6-bisfosfato, está regulado por el glucagón y la insulina (Fig. 15-19b).

Tal como vimos en el Capítulo 12 el glucagón estimula la adenilil ciclasa del hígado que sintetiza 3',5'-AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. A su vez, el AMP cíclico activa una proteína quinasa dependiente de cAMP, que transfiere un grupo fosforilo desde el ATP al enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2. La fosforilación de esta proteína potencia su actividad FBPasa-2 e inhibe su actividad PFK-2. De este modo el glucagón disminuye el nivel celular de fructosa 2,6-bisfosfato inhibiendo la glucólisis y estimulando la gluconeogénesis. La producción resultante de más glucosa permite que el hígado reponga los niveles de glucosa sanguínea en respuesta al glucagón. La insulina tiene el efecto opuesto ya que estimula la actividad de una fosfoproteína fosfatasa que cataliza la eliminación del grupo fosforilo de la proteína bifuncional PFK-2/FBPasa-2 aumentando su actividad PFK-2, que incrementa la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, con lo que se estimula la glucólisis y se inhibe la gluconeogénesis.

La xilulosa 5-fosfato es un regulador clave de los metabolismos glucídico y lipídico

Otro mecanismo regulador también actúa controlando la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato. En el hígado de mamíferos, la xiluosa 5-fosfato, un producto de la ruta de las pentosas fosfato (ruta de las hexosas monofosfato), favorece el incremento de la glucólisis que tiene lugar después de la ingestión de una comida rica en glúcidos. La concentración de xilulosa 5-fosfato aumenta a medida que la glucosa que entra en el hígado se convierte en glucosa 6-fosfato y se dirige tanto a la ruta glucolítica como a la de las pentosas fosfato. La xilulosa 5-fosfato activa la fosfoproteína fosfatasa 2A, (PP2A; **Figura 15-20)** que desfosforila al enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2 (Fig. 15-19). La desfosforilación activa la PFK-2 e inhibe la FBPasa-2 con lo que el consiguiente aumento de la [fructosa 2,6-bisfosfato] estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis. El aumento de la glucólisis dispara la producción de acetil-CoA mientras que el incremento en el flujo de hexosa a través de la ruta de las pentosas fosfato genera NADPH. El acetil-CoA y el NADPH son los materiales de partida para la síntesis de ácidos grasos de la que ya se sabe hace tiempo que aumenta de forma espectacular después de una comida rica en glúcidos. La xilulosa 5-fosfato también aumenta la síntesis de *todos* los enzimas requeridos para la síntesis de ácidos grasos de acuerdo con la predicción del análisis de control metabólico. Volveremos a comentar este efecto durante la discusión de la integración de los metabolismos glucídico y lipídico en el Capitulo 23.

El enzima glucolítico piruvato quinasa es inhibido alostéricamente por el ATP

En los vertebrados hay al menos tres isozimas de la piruvato quinasa que difieren en su distribución tisular y en su respuesta a los moduladores. Concentraciones elevadas de ATP, acetil-CoA, y ácidos grasos de cadena larga (indicadores de un suministro abundante de energía) inhiben alostéricamente todos los isozimas de la piruvato quinasa **(Fig. 15-21)**. El isozima hepático (forma L) pero no el isozima muscular (forma M), está sujeto a una regulación adicional por fosforilación. Cuando una baja concentración de glucosa en sangre

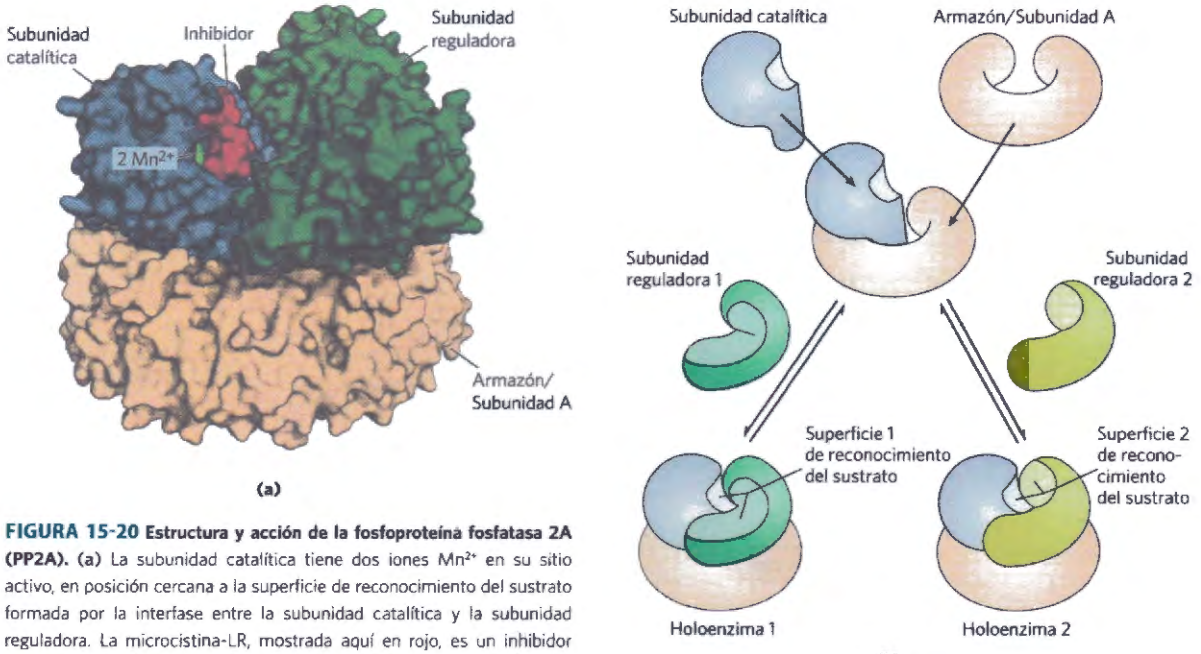


FIGURA 15-20 Estructura y acción de la fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A). **(a)** La subunidad catalítica tiene dos iones Mn^{2+} en su sitio activo, en posición cercana a la superficie de reconocimiento del sustrato formada por la interfase entre la subunidad catalítica y la subunidad reguladora. La microcistina-LR, mostrada aquí en rojo, es un inhibidor específico de la PP2A. Las subunidades catalítica y reguladoras descansan en un armazón (la subunidad A) que las sitúa en relación de una con la otra y da forma al sitio de reconocimiento de sustrato. **(b)** La PP2A reconoce varias proteínas diana y su especificidad viene dada por la subunidad reguladora. Cada una de las diversas subunidades reguladoras se encaja en el armazón que contiene la subunidad catalítica y cada subunidad reguladora crea su sitio de unión de sustrato único. [Fuente: (a) PDB ID 2NPP. Y. Xu et al., *Cell* 127:1239, 2006.]

provoca la liberación de glucagón, la proteína quinasa dependiente de cAMP fosforila el isozima L de la piruvato quinasa, inactivándolo. Esto disminuye la utilización de glucosa como combustible por el hígado, reservándola para su exportación al cerebro y otros órganos. En el músculo, el efecto del aumento de la [cAMP] es totalmente diferente. En respuesta a la adrenalina, el cAMP activa la degradación del glucógeno y la glucólisis y proporciona el combustible necesario para la respuesta de luchar o huir.

COPY-STATION

La conversión gluconeogénica del piruvato en fosfoenol piruvato se encuentra bajo múltiples tipos de regulación

En la ruta que conduce del piruvato a la glucosa el primer punto de control determina el destino del piruvato en la mitocondria. El piruvato se puede convertir en acetil-CoA (por el complejo de la piruvato deshidrogenasa para impulsar el ciclo de ácido cítrico (Capítulo

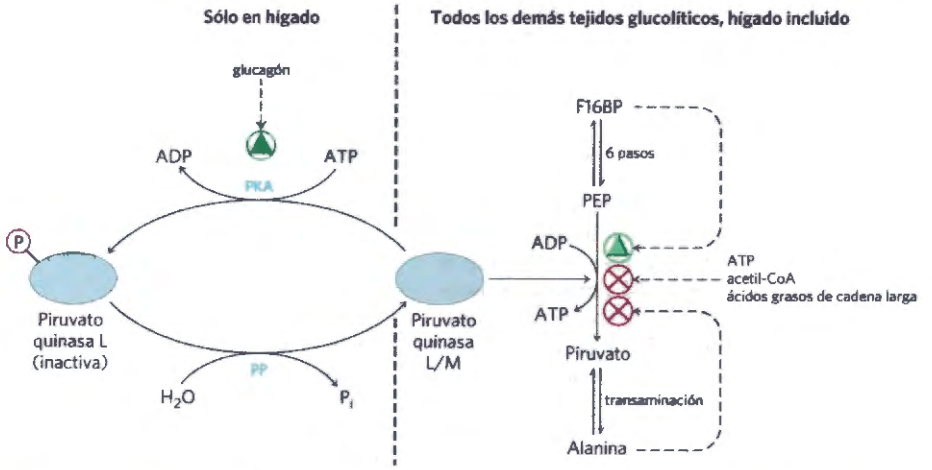


FIGURA 15-21 Regulación de la piruvato quinasa. El enzima está inhibido alostéricamente por el ATP, acetil-CoA y ácidos grasos de cadena larga (todos ellos signo de abundante suministro energético) mientras que la acumulación de fructosa 1,6-bisfosfato provoca su activación. La acumulación de alanina, que se puede sintetizar a partir del piruvato en un paso, inhibe alostéricamente la piruvato quinasa, haciendo más lenta la producción de piruvato por la glucólisis. El isozima hepático (forma L) también está regulado hormonalmente. El glucagón activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA; véase la Fig. 15-37), la cual fosforila el isozima L de la piruvato quinasa inactivándolo. Cuando desciende la concentración de glucagón, una proteína fosfatasa (PP) desfosforila la piruvato quinasa activándola. Este mecanismo impide que el hígado consuma glucosa a través de la glucólisis cuando la concentración de glucosa en sangre es baja; en lugar de ello el hígado exporta glucosa. Este mecanismo de fosforilación no afecta el isozima muscular (forma M).

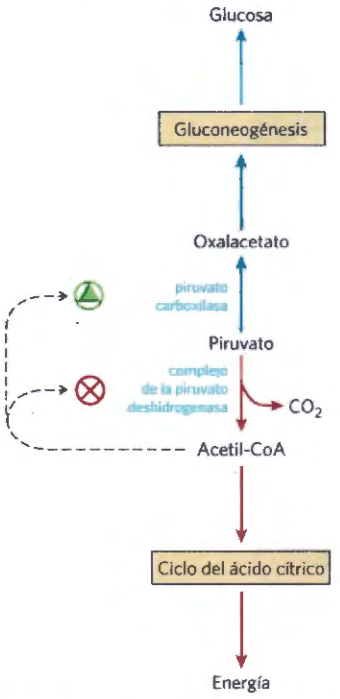


FIGURA 15-22 Dos destinos alternativos para el piruvato. El piruvato se puede convertir en glucosa y glucógeno vía gluconeogénesis o ser oxidado a acetil-CoA para la producción de energía. El primer enzima de cada ruta está regulado alostéricamente; el acetil-CoA producido por oxidación de los ácidos grasos o por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, estimula la piruvato carboxilasa e inhibe la piruvato deshidrogenasa.

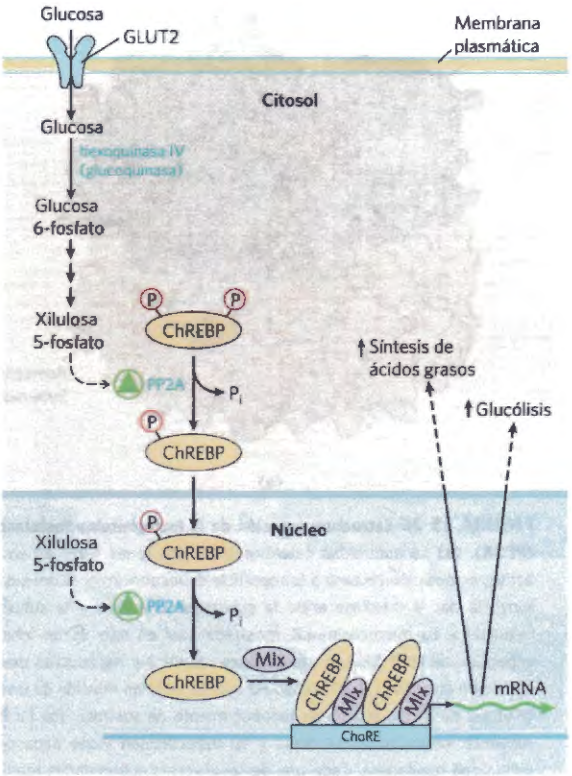


FIGURA 15-23 Mecanismo de regulación génica por el factor de transcripción ChREBP. Cuando el ChREBP en el citosol de un hepatocito está fosforilado en un residuo Ser y otro Thr, no puede entrar en el núcleo. La desfosforilación de Ⓟ-Ser por la proteína fosfatasa PP2A permite que ChREBP entre en el núcleo, en donde una segunda desfosforilación, de Ⓟ-Thr, activa ChREBP de manera que se puede asociar con su proteína afín, Mlx. ChREBP-Mlx se une ahora al elemento de respuesta de glúcidos (ChoRE) en el promotor y estimula la transcripción. PP2A es activada alostéricamente por xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato.

COPY-STATION

16), o en oxalacetato (por la piruvato carboxilasa) para iniciar el proceso de la gluconeogénesis **(Fig. 15-22)**. Cuando los ácidos grasos son fácilmente asequibles como combustible, su degradación en las mitocondrias hepáticas produce acetil-CoA, señal de que no es necesaria la oxidación de glucosa como combustible. El acetil-CoA es un modulador alostérico positivo de la piruvato carboxilasa y un modulador negativo de la piruvato deshidrogenasa, a través de la estimulación de una proteína quinasa que inactiva la deshidrogenasa. Cuando están satisfechas las demandas energéticas de la célula, la fosforilación oxidativa se hace más lenta, aumenta la [NADH] en relación a la [NAD^+] lo que inhibe el ciclo del ácido cítrico y se acumula acetil-CoA. El incremento en la concentración de acetil-CoA inhibe el complejo de la piruvato deshidrogenasa con lo que la formación de acetil-CoA a partir del piruvato se hace más lenta estimulándose la gluconeogénesis por activación de la piruvato carboxilasa. Esto permite que el exceso de piruvato se convierta en oxalacetato (y, en último término, en glucosa).

El oxalacetato formado de esta manera se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) en la reacción catalizada por la PEP carboxiquinasa (Fig. 15-13). En los mamíferos, la regulación de este enzima clave tiene lugar principalmente a nivel de su síntesis y degradación, en respuesta a señales de la dieta y hormonales. El ayuno o niveles elevados de glucagón actúan a través del cAMP para incrementar la velocidad de transcripción y estabilizar el mRNA. La insulina, o una concentración elevada de glucosa sanguínea, tienen los efectos opuestos. A continuación se analiza con mayor detalle esta regulación de la transcripción. Estos cambios, provocados generalmente por una señal exterior a la célula (dieta, hormonas), tienen lugar en una escala de tiempo de minutos a horas.

La regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis por cambios en la transcripción hace variar el número de moléculas de enzima

La mayor parte de las acciones reguladoras discutidas hasta el momento están mediadas por mecanismos rápidos fácilmente reversibles: efectos alostéricos, alteración covalente (fosforilación) del enzima o unión a una proteína reguladora. En otro conjunto de procesos reguladores intervienen cambios en el número de moléculas de un enzima en la célula, a través de cambios en el balance de la síntesis y degradación del enzima. Nuestra discusión se orienta ahora a la regulación de la transcripción a través de factores de transcripción activados por señales.

En el Capítulo 12 encontramos receptores nucleares y factores de transcripción en el contexto de la señalización por la insulina. La insulina actúa a través de su receptor en la membrana plasmática para activar al

TABLA 15-5 Algunos genes regulados por la insulina

Cambio en la expresión génica	Papel en el metabolismo de la glucosa
Expresión incrementada	
Hexoquinasa II Hexoquinasa IV Fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) Piruvato quinasa PFK-2/FBPasa-2	Esencial para la glucólisis, que consume glucosa como fuente de energía
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 6-Fosfogluconato deshidrogenasa Enzima málico	Produce NADPH, que es esencial para la conversión de glucosa en lípidos
ATP-citrato liasa Piruvato deshidrogenasa	Produce acetil-CoA, que es esencial para la conversión de glucosa en lípidos
Acetil-CoA carboxilasa Complejo de la ácido graso sintasa Estearil-CoA deshidrogenasa Acil-CoA-glicerol transferasas	Esencial para la conversión de glucosa en lípidos
Expresión disminuida	
PEP carboxiquinasa Glucosa 6-fosfatasa (subunidad catalítica)	Esencial para la producción de glucosa mediante la gluconeogénesis

menos dos rutas de señalización diferentes; en cada una de ellas se produce la activación de una proteína quinasa. La MAP quinasa ERK, por ejemplo, fosforila los factores de transcripción SRF y Elk1 (véase la Fig. 12-19) que a continuación estimulan la síntesis de enzimas necesarios para el crecimiento y la división celulares. La proteína quinasa B (PKB; también denominada Akt) fosforila otro conjunto de factores de transcripción (PDX1, por ejemplo) que estimulan la síntesis de enzimas que metabolizan glúcidos y grasas formados y almacenados después de un exceso de ingestión de glúcidos con la dieta. En las células β pancreáticas, PDX1 también estimula la síntesis de la misma insulina.

La insulina regula la transcripción de más de 150 genes; los humanos tienen al menos siete tipos generales de elementos de respuesta a la insulina, cada uno de los cuales es reconocido por un subconjunto de factores de transcripción activados por la insulina en diferentes condiciones. La insulina estimula la transcripción de los genes que codifican las hexoquinasas II y IV, PFK-1, piruvato quinasa y PFK-2/FBPasa-2 (todas ellas implicadas en la glucólisis y su regulación); diversos enzimas de la síntesis de ácidos grasos así como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzimas de la ruta de las pentosas fosfato que generan el NADPH necesario para la síntesis de los ácidos grasos. La insulina también reduce la expresión de los genes de dos enzimas de la gluconeogénesis: PEP carboxiquinasa y glucosa 6-fosfatasa (Tabla 15-5). Estos cambios tienen los efectos de (1) estimular reacciones que consumen glucosa (síntesis de glucógeno, ácidos grasos y triacilgliceroles) y (2) inhibir la producción y liberación de glucosa del hígado a la sangre.

Un factor de transcripción importante para el metabolismo glucídico es el **ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a glúcidos**; **Fig. 15-23**), que se expresa principalmente en el hígado, tejido adiposo y riñón. Sirve para coordinar la síntesis de enzimas necesarios para la síntesis de glúcidos y de grasas. El ChREBP en su forma inactiva está fosforilado y se localiza en el citosol. Cuando la fosfoproteína fosfatasa PP2A (Fig. 15-20) elimina un grupo fosforilo de ChREBP, el factor de transcripción puede entrar en el núcleo. Aquí la PP2A nuclear elimina otro grupo fosforilo y ahora el ChREBP se une a su proteína asociada, Mlx activando la síntesis de diversos enzimas: piruvato quinasa, ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa, primer enzima de la vía de la síntesis de ácidos grasos.

El control de la actividad PP2A, y de este modo, en último término, la síntesis de este grupo de enzimas metabólicos, corre a cargo de la xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 14-23). Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, la glucosa entra en el hígado y es fosforilada por la hexoquinasa IV. La glucosa 6-fosfato así formada puede entrar en la ruta glucolítica o en la ruta de las pentosas fosfato. Si lo hace en esta segunda, dos oxidaciones iniciales producen xilulosa 5-fosfato que actúa de señal de que las rutas de utilización de la glucosa están bien abastecidas de sustrato. Esto lo consigue activando alostéricamente la PP2A que, a continuación, desfosforila ChREBP permitiendo que el factor de transcripción active la expresión de los genes que codifican los enzimas de la glucólisis y de la síntesis de ácidos grasos (Fig. 15-23). La glucólisis produce piruvato y la conversión del piruvato en acetil-CoA proporciona el material de partida para la síntesis de ácidos grasos: la acetil-CoA carboxilasa convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, primer intermediario comprometido en la ruta hacia los ácidos grasos. El complejo de la ácido graso sintasa produce ácidos grasos que se exportan al tejido adiposo y se almacenan en forma de triacilgliceroles (Capítulo 21). De esta forma, el exceso de glúcido de la dieta se almacena en forma de grasa.

Otro factor de transcripción hepático, **SREBP-1c**, un miembro de la familia de **proteínas de unión a elementos reguladores de los esteroles** (véase la Fig. 21-44) activa la síntesis de piruvato quinasa, hexoquinasa IV, lipoproteína lipasa, acetil-CoA carboxilasa y

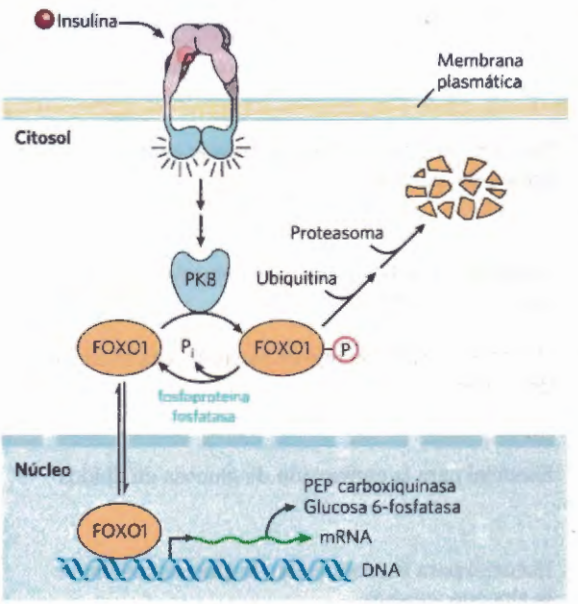
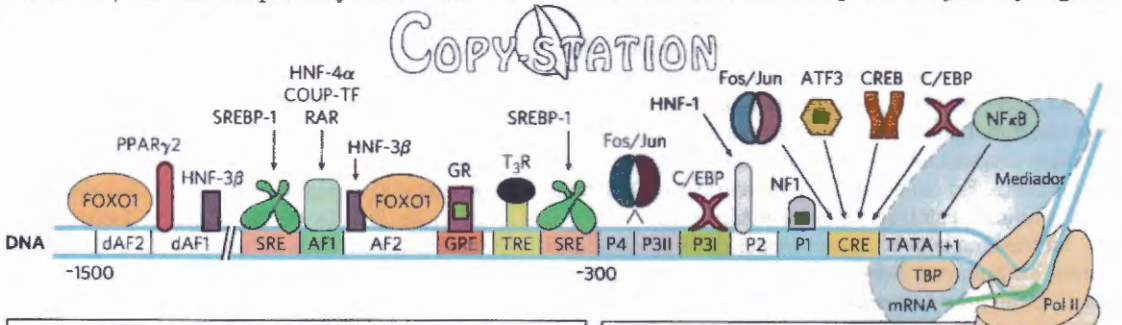


FIGURA 15-24 Mecanismo de regulación génica por el factor de transcripción FOXO1. La insulina activa la cascada de señalización mostrada en la Figura 12-20, que lleva a la activación de la proteína quinasa B (PKB). FOXO1 en el citosol es fosforilado por PKB y el factor de transcripción fosforilado es marcado por la unión de ubiquitina para su degradación por proteasomas. El FOXO1 que permanece sin fosforilar o que es desfosforilado puede entrar en el núcleo, se une a un elemento de respuesta y desencadena la transcripción de los genes asociados. La insulina tiene, por tanto, el efecto de *inactivar* la expresión de estos genes, que incluyen la PEP carboxiquinasa y la glucosa 6-fosfatasa.

el complejo de la ácido graso sintasa que convierten el acetil-CoA (producido a partir del piruvato) en ácidos grasos para su almacenamiento en los adipocitos. La síntesis de SREBP-1c es estimulada por la insulina y reprimida por el glucagón. SREBP-1c también suprime la expresión de diversos enzimas gluconeogénicos: glucosa 6-fosfatasa, PEP carboxiquinasa y FBPasa-1.

El factor de transcripción **CREB (proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP)** activa la síntesis de glucosa 6-fosfatasa y PEP carboxiquinasa en respuesta a un aumento en la [cAMP] promovida por el glucagón. Por el contrario, la *inactivación*, estimulada por la insulina, de otros factores de transcripción inactiva diversos enzimas gluconeogénicos en el hígado: PEP carboxiquinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, el transportador de glucosa 6-fosfato del retículo endoplasmático y la glucosa 6-fosfatasa. Por ejemplo, **FOXO1 (forkhead box other)** estimula la síntesis de enzimas gluconeogénicos y suprime la síntesis de los enzimas de la glucólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y de la síntesis de triacilgliceroles **(Fig. 15-24)**. En su forma desfosforilada, FOXO1 actúa como factor de transcripción nuclear. En respuesta a la insulina, FOXO1 abandona el núcleo y es fosforilado en el citosol por PKB, a continuación es marcado por la ubiquitina y degradado

COPY-STATION



Factores de transcripción	
FOXO1	forkhead box other 1
PPARγ2	receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ2
HNF-3β	factor nuclear hepático 3β
SREBP-1	proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1
HNF-4α	factor nuclear hepático 4α
COUP-TF	factor de transcripción del promotor corriente arriba de la ovalbúmina de gallina
RAR	receptor del ácido retinoico
GR	receptor de glucocorticoides
T_3R	receptor de la hormona tiroidea
C/EBP	proteína de unión potenciadora de CAAT
HNF-1	factor nuclear hepático 1
NF1	factor nuclear 1
ATF3	factor activador de la transcripción 3
CREB	proteína de unión al elemento de regulación de cAMP
NFκB	factor nuclear κB
TBP	proteína de unión a la secuencia TATA
TFIIH	factor de transcripción IIH

Elementos de respuesta y sitios de unión reguladores en el promotor	
dAF2	factor accesorio distal 2
dAF1	factor accesorio distal 1
SRE	elemento regulador de esteroles
AF1	factor accesorio 1
AF2	factor accesorio 2
GRE	elemento regulador de glucocorticoides
TRE	elemento regulador de la hormona tiroidea
CRE	elemento regulador de cAMP

FIGURA 15-25 Región promotora de la PEP carboxiquinasa, en donde se muestra la complejidad de las señales reguladoras de este gen. Este diagrama muestra los factores de transcripción (los íconos más pequeños unidos al DNA) que se sabe que regulan la transcripción del gen de la PEP carboxiquinasa. La magnitud con la que se expresa el gen depende de la señal combinada que afecta a todos estos factores y que puede reflejar la disponibilidad de nutrientes, la concentración de glucosa en sangre y otras circunstancias que afectan las necesidades de la célula hacia este enzima en un momento determinado. P1, P2, P3I, P3II y P4 son sitios de unión de proteína identificados por el método de la huella con la DNasa I (véase el Recuadro 26-1). La secuencia TATA es el punto de unión para el complejo de transcripción de la RNA polimerasa II (Pol II). [Fuente: Información de K. Chakravarty, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40:129, 2005, Fig. 2].

RECUADRO 15-3 MEDICINA Mutaciones genéticas causantes de formas raras de diabetes

El término "diabetes" describe diversas situaciones médicas que tienen en común la producción en exceso de orina. En el Recuadro 11-1 describimos la diabetes insípida, en la que la reabsorción defectuosa de agua en el riñón es el resultado de una mutación en el gen de la acuoporina. La "diabetes mellitus" se refiere específicamente a la enfermedad en la que está alterada la capacidad de metabolizar glucosa debido a un fallo del páncreas para producir insulina o la resistencia de los tejidos a las acciones de la insulina.

Existen dos tipos principales de diabetes mellitus. El tipo I, también llamada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), es debida al ataque autoinmune sobre las células β del páncreas productoras de insulina. Los individuos con IDDM han de administrarse insulina por vía inyectable o por inhalación para compensar su carencia de células β. La IDDM se desarrolla durante la infancia o en la adolescencia; un nombre antiguo de la enfermedad era diabetes juvenil. El tipo 2, también llamado diabetes mellitus independiente de insulina (NIDDM), se desarrolla de forma típica en adultos de más de 40 años de edad. Es mucho más frecuente que la IDDM y su aparición entre la población está fuertemente correlacionada con la obesidad. La epidemia actual de obesidad en los países más desarrollados lleva consigo la promesa de una epidemia de NIDDM, lo que constituye un fuerte incentivo para conocer la relación entre obesidad y aparición de NIDDM tanto a nivel genético como bioquímico. Después de completar nuestra visión del metabolismo de grasas y proteínas en capítulos posteriores, volveremos (en el Capítulo 23) a la discusión de la diabetes que tiene un efecto amplio sobre el metabolismo: de los glúcidos, grasas y proteínas.

Aquí consideramos otro tipo de diabetes en la que está alterado el metabolismo de glúcidos y grasas: la diabetes de aparición madura en los jóvenes (MODY), en la que la mutación genética afecta un factor de transcripción importante en el transporte de la señal de la insulina al núcleo o afecta al enzima que responde a la insulina. En MODY2, una mutación del gen de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) afecta al hígado y páncreas, tejidos en los que ésta es la principal isoforma de la hexoquinasa. La glucoquinasa de las células β pancreáticas actúa como sensor de la glucosa. Normalmente, cuando se eleva la glucosa sanguínea, también aumenta la glucosa en las células β y, dado que la glucoquinasa tiene una K_m relativamente elevada para la glucosa, su actividad aumenta con el aumento de la concentración sanguínea de glucosa. El metabolismo de la glucosa 6–fosfato formada en esta reacción aumenta el nivel de ATP en las células β lo que provoca la liberación de insulina según el mecanismo mostrado en la Figura 23-28. En los individuos sanos, las concentraciones de glucosa sanguínea de ~5 mM desencadenan la liberación de insulina. Pero los individuos con mutaciones desactivadoras en ambas copias del gen de la glucoquinasa tienen umbrales muy elevados para la liberación de insulina y, en consecuencia, desde el nacimiento presentan hiperglucemia severa, es decir diabetes neonatal permanente. En los individuos que tienen una copia mutada y otra normal del gen de la glucoquinasa, el umbral de glucosa para la liberación de insulina aumenta a aproximadamente 7 mM. En consecuencia, estos individuos tienen unos niveles de glucosa en sangre ligeramente superiores a lo normal: habitualmente tienen una hiperglucemia suave sin síntomas. Esta enfermedad (MODY2) se descubre generalmente por accidente durante análisis rutinarios de glucosa en sangre.

Hay al menos otros cinco tipos de MODY, siendo cada uno el resultado de una mutación inactivadora en uno u otro de los factores de transcripción esenciales para el desarrollo normal y función de las células β pancreáticas. Los individuos con estas mutaciones tienen grados diversos de producción disminuida de insulina con los defectos asociados para la homeostasis de la glucosa sanguínea. En MODY1 y MODY3, los defectos son suficientemente graves por lo que se producen las complicaciones a largo plazo asociadas con IDDM y NIDDM: problemas cardiovasculares, fallo renal y ceguera. MODY4, 5 y 6 son formas menos graves de la enfermedad. En conjunto, las enfermedades MODY representan un pequeño porcentaje de los casos de NIDDM. También son muy raros los individuos con mutaciones en el gen de la propia insulina; presentan defectos en la señalización por la insulina de gravedad diversa.

Copyrighted Material

por el proteasoma. El glucagón impide esta fosforilación por PKB con lo que FOXO1 permanece activo en el núcleo.

Por muy complicado que pueda parecer el proceso antes esbozado, se está demostrando que la regulación de los genes que codifican enzimas del metabolismo de glúcidos y grasas es mucho más complejo y sutil de lo que aquí hemos mostrado. Numerosos factores de transcripción pueden actuar sobre el mismo promotor génico; múltiples proteína quinasas y fosfatasas pueden activar o inactivar estos factores de transcripción; además, diversos factores proteicos accesorios modulan la acción de los factores de transcripción. Esta complejidad es manifiesta, por ejemplo, en el gen que codifica la PEP carboxiquinasa, un caso muy bien estudiado de control de la transcripción. Su región promotora **(Fig. 15-25)** tiene 15 o más elementos de respuesta reconocidos por, al menos, una docena de factores de transcripción conocidos y otros que probablemente se descubrirán en el futuro. Los factores de transcripción actúan de manera combinada en esta región promotora, y en centenares de otros promotores génicos, para afinar con precisión los niveles de centenares de enzimas metabólicos y coordinando su actividad en el metabolismo de glúcidos y grasas. La importancia crítica de los factores de transcripción en la regulación metabólica es aparente al

observar los efectos de mutaciones en sus genes. Por ejemplo, al menos cinco tipos diferentes de diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes (MODY) están asociados con mutaciones en factores de transcripción específicos (Recuadro 15-3).

RESUMEN 15.3 Regulación coordinada de la glucólisis y la gluconeogénesis

- La gluconeogénesis y la glucólisis comparten siete enzimas que catalizan las reacciones reversibles de las rutas. En los tres pasos restantes, las reacciones directa e inversa están catalizadas por enzimas diferentes, siendo éstos los puntos de regulación de las dos rutas.
- La hexoquinasa IV (glucoquinasa) tiene propiedades cinéticas relacionadas con su papel especial en el hígado: libera glucosa a la sangre cuando la glucosa sanguínea es baja y capta y metaboliza la glucosa cuando la glucosa sanguínea es elevada.
- La PFK-1 se inhibe alostéricamente por el ATP y el citrato. En la mayoría de tejidos de mamífero, hígado incluido, la PFK-1 se activa alostéricamente por la fructosa 2,6-bisfosfato.
- La piruvato quinasa se inhibe alostéricamente por el ATP y el isozima hepático es también inhibido por fosforilación dependiente de cAMP.
- La gluconeogénesis está regulada a nivel de la piruvato carboxilasa (que es activada por el acetil-CoA) y de la FBPasa-1 (que es inhibida por la fructosa 2,6-bisfosfato y por el AMP).
- Para limitar el ciclado de sustrato entre la glucólisis y la gluconeogénesis, las dos rutas están bajo control alostérico recíproco que se consigue mayoritariamente por los efectos opuestos de la fructosa 2,6-bisfosfato sobre la PFK-1 y la FBPasa-1.
- El glucagón o la adrenalina disminuyen la [fructosa 2,6-bisfosfato], al aumentar la [cAMP] y fosforilar el enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2. La insulina aumenta la [fructosa 2,6-bisfosfato] al activar una fosfoproteína fosfatasa que desfosforila la PFK-2, activándola.
- La xilulosa 5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato, activa la fosfoproteína fosfatasa PP2A que desfosforila varias proteínas diana, entre ellas PFK-2/FBPasa-2 inclinando el equilibrio hacia la captación de glucosa, síntesis de glucógeno y síntesis de lípidos en el hígado.
- Factores de transcripción, entre los que se cuentan ChREBP, CREB, SREBP y FOXO1 actúan en el núcleo regulando la expresión de genes específicos que codifican enzimas de las rutas glucolítica y gluconeogénica. La insulina y el glucagón actúan de manera antagonista en la activación de estos factores de transcripción con lo que activan e inhiben gran número de genes.

15.4 Metabolismo del glucógeno en animales

Nuestra discusión sobre la regulación metabólica, utilizando el metabolismo glucídico como ejemplo principal, considera ahora la síntesis y degradación del glucógeno. En esta sección nos fijamos en las rutas metabólicas; en la Sección 15.5 abordaremos los mecanismos de regulación.

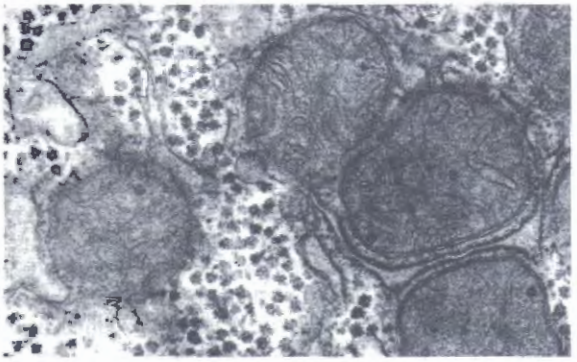


FIGURA 15-26 Gránulos de glucógeno en un hepatocito. El glucógeno es una forma de almacenamiento de glúcidos que aparece como partículas de alta densidad electrónica, a menudo formando agregados o rosetas. En los hepatocitos el glucógeno está íntimamente asociado con túbulos del retículo endoplasmático liso. En esta micrografía también se ven cinco mitocondrias. [Fuente: BCC Microimaging. Reproducido con permiso.]

El exceso de glucosa se convierte en formas poliméricas para su almacenamiento: glucógeno en los vertebrados y muchos microorganismos, almidón en las plantas. En los vertebrados el glucógeno se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo esquelético; puede representar hasta el 10% del peso del hígado y el 1 al 2% del peso del músculo. Si toda esta cantidad de glucosa se disolviese en el citosol de un hepatocito, su concentración sería de aproximadamente 0,4 M, una cantidad suficiente para dominar las propiedades osmóticas de la célula. Sin embargo, cuando se almacena en forma de polímero largo (glucógeno) la misma masa de glucosa tiene una concentración de sólo 0,01 μM. El glucógeno se almacena en forma de grandes gránulos citosólicos. La partícula elemental de glucógeno, la partícula β, de unos 21 nm de diámetro consiste en unos 55.000 residuos de glucosa con unos 2.000 extremos no reductores. Entre 20 y 40 de estas partículas se agrupan formando rosetas α que son fácilmente visibles al microscopio en muestras de tejido de animales bien alimentados **(Fig. 15-26)** si bien están prácticamente ausentes en los animales sometidos a un ayuno de 24 horas.

El glucógeno del músculo se encuentra allí para proporcionar una fuente de energía rápida para el metabolismo tanto aeróbico como anaeróbico. El glucógeno muscular se puede agotar en menos de una hora durante la actividad vigorosa. El glucógeno hepático sirve como almacén de glucosa para otros tejidos cuando no está disponible glucosa en la dieta (entre comidas o durante el ayuno); esto es de interés especial para las neuronas del cerebro que no pueden utilizar ácidos grasos como combustible. El glucógeno hepático puede desaparecer en un período de 12 a 24 horas. En el hombre, la cantidad total de energía almacenada en forma de glucógeno es mucho menor que la cantidad almacenada en forma de grasa (triacilglicerol) (véase la Tabla 23-6), pero las grasas no se pueden convertir en glucosa en los vertebrados y no se pueden catabolizar anaeróbicamente.

Los gránulos de glucógeno son agregados complejos de glucógeno y de los enzimas que lo sintetizan y

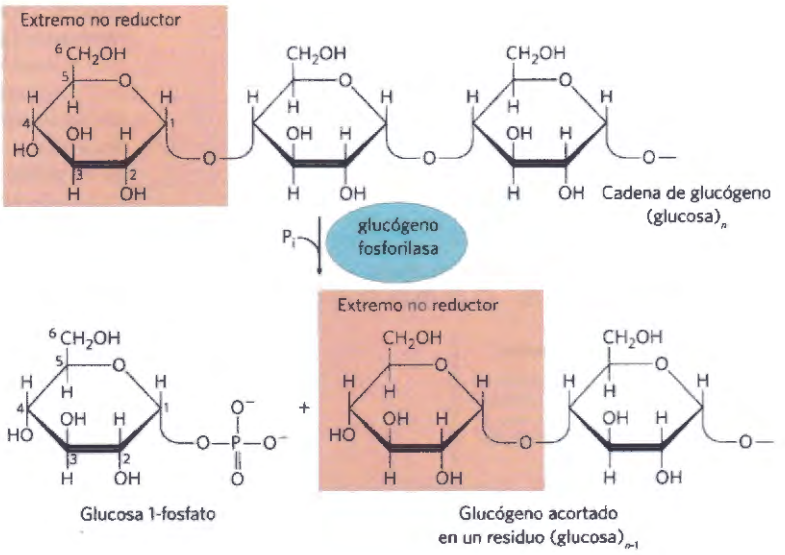


FIGURA 15-27 Eliminación de un residuo de glucosa del extremo no reductor de una cadena de glucógeno por la glucógeno fosforilasa. Este proceso es repetitivo; el enzima elimina residuos de glucosa sucesivos hasta que alcanza la cuarta unidad de glucosa desde un punto de ramificación (véase Fig. 15-28).

degradan así como la maquinaria utilizada para regular estos enzimas. Los mecanismos generales de almacenamiento y movilización del glucógeno son los mismos en el músculo que en el hígado si bien los enzimas difieren en aspectos sutiles, aunque importantes, que reflejan los diferentes papeles del glucógeno en los dos tejidos. El glucógeno también se obtiene de la dieta y se degrada en el intestino, lo que implica un conjunto diferente de enzimas hidrolíticos que convierten el glucógeno en glucosa libre. (El almidón de la dieta se hidroliza de forma similar). Empezaremos nuestra discusión con la degradación del glucógeno a glucosa 1-fosfato (**glucogenólisis**) para, a continuación, examinar la síntesis de glucógeno (**glucogénesis**).

La degradación del glucógeno está catalizada por la glucógeno fosforilasa

En el músculo esquelético y en el hígado las unidades de glucosa de las ramas exteriores del glucógeno entran en la ruta glucolítica a través de la acción de tres enzimas: glucógeno fosforilasa, enzima desramificador del glucógeno y fosfoglucomutasa. La glucógeno fosforilasa cataliza la reacción en la que el enlace glucosídico (α1→ 4) que une dos residuos de glucosa en un extremo no reductor del glucógeno es atacado por el fosfato inorgánico (P_i), eliminando el residuo glucosa terminal en forma de **α-D-glucosa 1-fosfato (Fig. 15-27)**. Esta reacción de *fosforólisis* es diferente de la *hidrólisis* de enlaces glucosídicos por la amilasa durante la degradación intestinal del glucógeno o del almidón de la dieta. En la fosforólisis, se conserva parte de la energía del enlace glucosídico en la formación del éster fosfato, glucosa 1-fosfato (véase la Sección 14.2).

El piridoxal fosfato es un cofactor esencial en la reacción de la glucógeno fosforilasa; su grupo fosfato actúa como catalizador ácido general, promoviendo el ataque del P_i sobre el enlace glucosídico. (Éste es un papel inusual del piridoxal fosfato. En la Fig. 18-6 se describirá con detalle un papel más típico como cofactor en el metabolismo de los aminoácidos).

La glucógeno fosforilasa actúa repetitivamente sobre los extremos no reductores de las ramas del glucógeno hasta que alcanza un punto que se halla a cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación (α1→6) (véase la Fig. 7-13) en donde se detiene su acción. La degradación posterior por la glucógeno fosforilasa sólo puede tener lugar después de la acción de un **enzima desramificante,** formalmente conocido como **oligo (α1→6) a (α1→4) glucantransferasa**, que cataliza dos reacciones sucesivas que transfieren ramificaciones **(Fig. 15-28)**. Una vez transferidas las ramificaciones y se ha hidrolizado el residuo glucosilo en C-6, la glucógeno fosforilasa continúa su actividad.

COPYSTATION

La glucosa 1-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, reponer la glucosa sanguínea

La glucosa 1-fosfato, producto final de la reacción de la glucógeno fosforilasa, se convierte en glucosa 6-fosfato por la **fosfoglucomutasa,** que cataliza la reacción reversible

$$\text{Glucosa 1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato}$$

Inicialmente fosforilada en un residuo Ser, el enzima cede un grupo fosforilo al C-6 del sustrato y a continuación acepta un grupo fosforilo del C-1 **(Fig. 15-29)**.

La glucosa 6-fosfato formada a partir del glucógeno en el músculo esquelético puede entrar en la glucólisis y servir como fuente de energía para sostener la contracción muscular. En el hígado, la degradación del glucógeno sirve para un propósito diferente: liberar glucosa a la sangre cuando disminuye el nivel de glucosa sanguínea, tal como sucede entre comidas. Esto requiere el enzima glucosa 6-fosfatasa, que está presente en el hígado y riñón, pero no en otros tejidos. El enzima es una proteína integral de membrana del retículo endoplasmático, de la que se predice que contiene nueve hélices transmembrana, con su sitio activo en el lado de la luz del RE. La glucosa 6-fosfato formada en el citosol se transporta a la luz del RE mediante un transportador específico (T1) **(Fig. 15-30)** y se hidroliza en la superficie luminal por la glucosa 6-fosfatasa. Se cree que el P_i y la glucosa resultantes vuelven al citosol mediante dos transportadores diferentes (T2 y T3) y

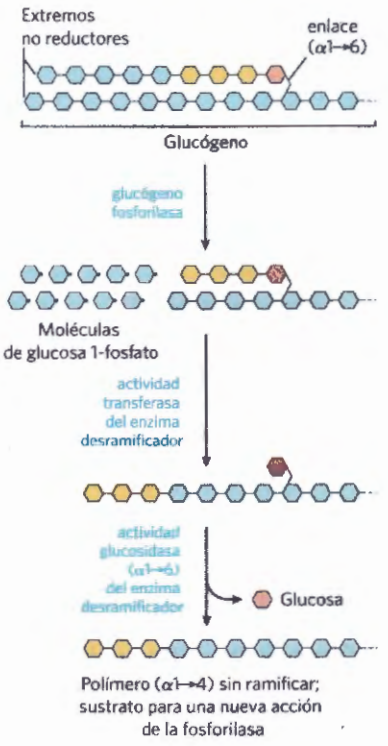


FIGURA 15-28 Degradación del glucógeno cerca de un punto de ramificación (α1→6). Después de la eliminación secuencial de residuos terminales de glucosa por la glucógeno fosforilasa (véase la Fig. 15-27), los residuos de glucosa cercanos a un punto de ramificación son eliminados mediante un proceso en dos etapas que requiere un enzima desramificador bifuncional. En primer lugar la actividad transferasa del enzima desplaza un bloque de tres residuos de glucosa desde la ramificación a un extremo no reductor cercano al que se unen por enlace (α1→4). El único residuo de glucosa restante en el punto de ramificación, en enlace (α1→6) se libera a continuación como glucosa libre por la actividad glucosidasa (α1→6) del enzima. Los residuos de glucosa se muestran de forma abreviada omitiéndose los grupos -H, -OH y -CH_2OH de los anillos de piranosa.

que la glucosa abandona el hepatocito mediante el transportador de la membrana plasmática, GLUT2. Observe que al estar el sitio activo de la glucosa 6-fosfatasa dentro de la luz del RE, la célula separa esta reacción del proceso de la glucólisis, que tiene lugar en el citosol y sería abortado por la acción de la glucosa 6-fosfatasa. Defectos genéticos tanto en la glucosa 6-fosfatasa como en T1 producen trastornos importantes del metabolismo del glucógeno dando lugar a la enfermedad del almacenamiento del glucógeno tipo Ia (Recuadro 15-4).

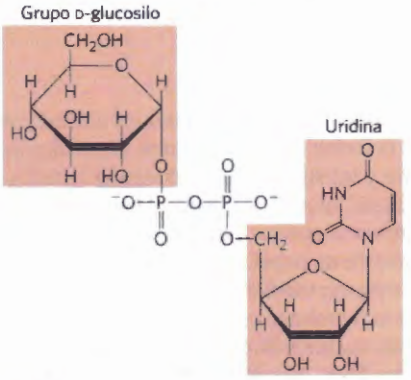
Debido a que los tejidos muscular y adiposo carecen de glucosa 6-fosfatasa, no pueden convertir la glucosa 6-fosfato formada por degradación del glucógeno en glucosa, por lo que estos tejidos no aportan glucosa a la sangre.

El nucleótido-azúcar UDP-glucosa aporta glucosa para la síntesis de glucógeno



Luis Leloir, 1906–1987 [Fuente: AP Photo/John Lindsay.]

En muchas de las reacciones en las que se transforman o polimerizan las hexosas intervienen **nucleótidos-azúcar**, compuestos en los que el carbono anomérico de un azúcar es activado por unión de un nucleótido a través de un enlace éster fosfato. Los nucleótidos-azúcar son los sustratos para la polimerización de los monosacáridos a disacáridos, glucógeno, almidón, celulosa y polisacáridos extracelulares más complejos. Son también intermediarios clave en la producción de aminohexosas y desoxihexosas encontradas en algunos de estos polisacáridos, y en la síntesis de vitamina C (ácido L-ascórbico). El papel de los nucleótidos-azúcar en la biosíntesis de glucógeno y de muchos derivados glucídicos fue descubierto en 1953 por el bioquímico argentino Luís Leloir.



UDP-glucosa
(un nucleótido-azúcar)

COPY-STATION

La adecuación de los nucleótidos-azúcar a las reacciones biosintéticas se debe a varias propiedades:

1. Su formación es metabólicamente irreversible, contribuyendo de este modo a la irreversibilidad de las rutas biosintéticas en las que son intermediarios. La condensación de un nucleósido trifosfato con una hexosa 1-fosfato para formar un nucleótido-azúcar tiene una variación pequeña de energía libre positiva en la célula, pero la reacción libera PP_i que es rápidamente hidrolizado por la pirofosfato inorgánico hidrolasa **(Fig. 15-31)**, en una reacción que es muy exergónica ($\Delta G'^{\circ}$ = -19,2 kJ/mol). Esto mantiene baja la concentración celular de PP_i, lo que asegura que la variación real de energía libre en la célula sea favorable. En efecto, la eliminación rápida del producto, impulsada por la gran variación negativa de energía libre que resulta de la hidrólisis del PP_i, impulsa la reacción sintética, una estrategia común en muchas reacciones de polimerización biológicas.

2. Aunque en las transformaciones químicas de los nucleótidos-azúcar no intervienen átomos del propio nucleótido, la parte nucleotídica ofrece muchos grupos potenciales para el establecimiento de interacciones no covalentes con los enzimas; la energía libre de fijación adicional contribuye de manera significativa a la actividad catalítica del enzima (Capítulo 6; véase también las p. 311).

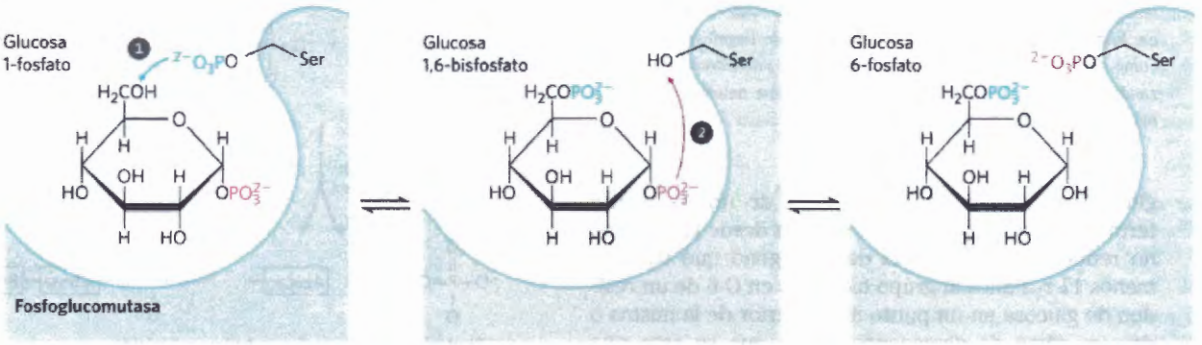


FIGURA 15-29 Reacción catalizada por la fosfoglucomutasa. La reacción empieza con el enzima fosforilado en un residuo Ser. En el paso ❶ el enzima cede su grupo fosforilo (azul) a la glucosa 1-fosfato produciendo glucosa 1,6-bisfosfato. En el paso ❷, el grupo fosforilo en C-1 de la glucosa 1,6-bisfosfato (rojo) se vuelve a transferir al enzima, volviendo a formar el fosfoenzima y produciendo glucosa 6-fosfato.

3. Al igual que el fosfato, el grupo nucleotidilo (UMP o AMP, por ejemplo) es un excelente grupo saliente, que facilita el ataque nucleofílico al activar el carbono del glúcido al que está unido.
4. Mediante el "marcado" de algunas hexosas con grupos nucleotidilo, las células pueden dejarlos aparte para un objetivo (síntesis de glucógeno, por ejemplo), en un fondo diferente del de las hexosas fosfato marcadas para otro objetivo (tal como la glucólisis).

La síntesis de glucógeno tiene lugar virtualmente en todos los tejidos animales pero es especialmente importante en el hígado y en el músculo esquelético. El punto de inicio de la síntesis de glucógeno es la glucosa-6-fosfato. Tal como vimos puede provenir de la glucosa libre en una reacción catalizada por los isozimas hexoquinasa I y hexoquinasa II en el músculo y por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) en el hígado:

D-Glucosa + ATP --> D-glucosa 6-fosfato + ADP

Sin embargo, una parte de la glucosa ingerida va a parar al glucógeno por una vía menos directa. Es captada primeramente por los eritrocitos convirtiéndose glucolíticamente en lactato; éste es a continuación captado por el hígado y convertido en glucosa 6-fosfato mediante gluconeogénesis.

Para iniciar la síntesis de glucógeno, la glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa-1-fosfato en la reacción de la fosfoglucomutasa:

$$\text{Glucosa 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa 1-fosfato}$$

El producto de esta reacción se convierte en UDP-glucosa por acción de la **UDP-glucosa pirofosforilasa** es una reacción clave en la biosíntesis del glucógeno:

$$\text{Glucosa 1-fosfato} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDP-glucosa} + PP_i$$

Observe que este enzima se denomina por la reacción inversa; en la célula, esta reacción transcurre en la dirección de formación de la UDP-glucosa debido a que el pirofosfato se hidroliza rápidamente a fosfato inorgánico por la pirofosfato inorgánico hidrolasa (Fig. 15-31).

La UDP-glucosa es el dador inmediato de residuos de glucosa en la reacción catalizada por la **glucógeno sintasa**, la cual promueve la transferencia del residuo de glucosa desde la UDP-glucosa a un extremo no reductor de una molécula ramificada de glucógeno **(Fig. 15-32)**. El equilibrio global de la ruta desde glucosa 6-fosfato al glucógeno alargado en una unidad de glucosa favorece enormemente la síntesis del glucógeno.

La glucógeno sintasa no puede formar los enlaces ($\alpha 1 \rightarrow 6$) que se encuentran en los puntos de ramificación del glucógeno; la formación de estos enlaces corre a cargo del enzima ramificador del glucógeno, también llamado **amilo (1→4) a (1→6) transglucosilasa** o glucosil-(4→6)-transferasa. El enzima ramificador del

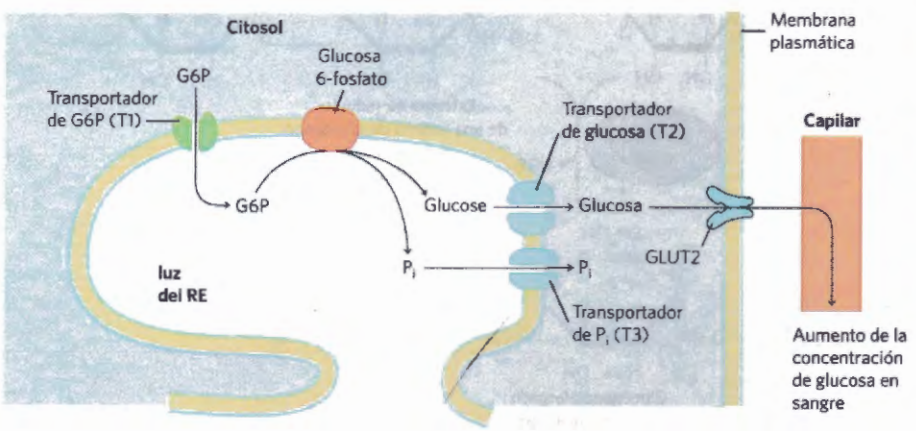
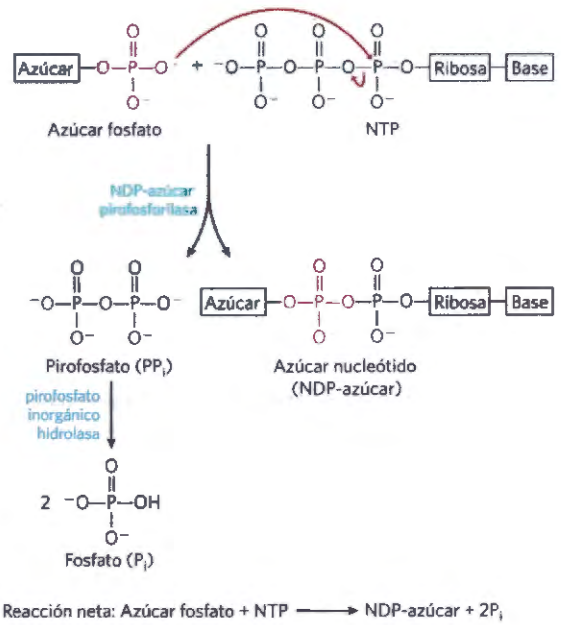


FIGURA 15-30 Hidrólisis de la glucosa 6-fosfato por la glucosa 6-fosfatasa del RE. El sitio catalítico de la glucosa 6-fosfatasa está encarado hacia la luz del RE. Un transportador (T1) de glucosa 6-fosfato (G6P) transporta el sustrato desde el citosol a la luz y los productos glucosa y P_i pasan al citosol mediante transportadores específicos (T2 y T3). La glucosa abandona la célula vía el transportador GLUT2 de la membrana plasmática.

FIGURA 15-31 Formación de un nucleótido azúcar. Se produce una reacción de condensación entre un nucleósido trifosfato (NTP) y un azúcar fosfato. El oxígeno del azúcar fosfato cargado negativamente actúa como nucleófilo atacando el fosfato α del nucleósido trifosfato y desplazando pirofosfato. La reacción es impulsada hacia delante gracias a la hidrólisis del PP_i por la pirofosfato inorgánico hidrolasa.



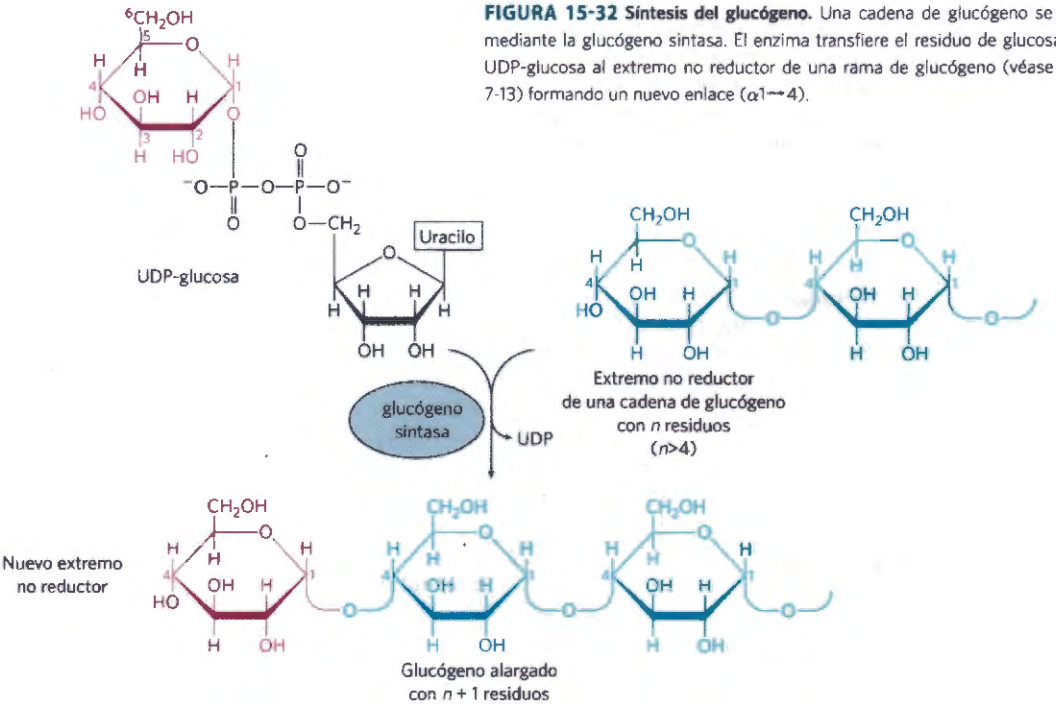
glucógeno cataliza la transferencia de un fragmento terminal de 6 ó 7 residuos de glucosa desde el extremo no reductor de una rama de glucógeno que tiene al menos 11 residuos al grupo hidroxilo en C-6 de un residuo de glucosa en un punto más interior de la misma o de otra rama de glucógeno, con lo que se crea una nueva rama **(Fig. 15-33)**. La glucógeno sintasa puede añadir más residuos de glucosa a la nueva rama. El efecto biológico de la ramificación es que la molécula de glucógeno sea más soluble al tiempo que se aumenta el número de extremos no reductores. Esto aumenta el número de sitios accesibles tanto para la glucógeno fosforilasa como para la glucógeno sintasa, enzimas que sólo actúan en extremos no reductores.

La glucogenina incorpora los residuos iniciales de azúcar del glucógeno

La glucógeno sintasa no puede iniciar de novo una nueva cadena de glucógeno. Requiere un cebador, habitualmente una cadena o una rama preformadas de (α1⟶4) poliglucosa que tenga como mínimo ocho residuos de glucosa. ¿Cómo se inicia una *nueva* molécula de glucógeno? Una curiosa proteína denominada **glucogenina (Fig.15-34)**, es a la vez el cebador sobre el que se unen nuevas cadenas y el enzima que catalizado su unión. El primer paso en la síntesis de una nueva molécula de glucógeno es la transferencia de un residuo de glucosa desde la UDP-glucosa al grupo hidroxilo de la Tyr^{194} de la glucogenina catalizado por la actividad glucosiltransferasa intrínseca de la proteína **(Fig. 15-35)**. La cadena naciente se extiende mediante la adición secuencial de otros siete residuos de glucosa cada uno de ellos procedentes de la UDP-glucosa; las reacciones son catalizadas por la actividad de alargamiento de la cadena de la glucogenina. En este punto la glucógeno sintasa toma el relevo continuando la extensión de la cadena de glucógeno. La glucogenina permanece sepultada dentro de la partícula β unida de forma covalente al único extremo reductor de la molécula de glucógeno (Fig. 15-35b). La debilidad muscular y fatiga, desaparición de glucógeno hepático y pulso irregular (arritmia cardíaca) son algunas de las consecuencias médicas de

Mobi-Station

FIGURA 15-32 Síntesis del glucógeno. Una cadena de glucógeno se alarga mediante la glucógeno sintasa. El enzima transfiere el residuo de glucosa de la UDP-glucosa al extremo no reductor de una rama de glucógeno (véase la Fig. 7-13) formando un nuevo enlace (α1⟶4).



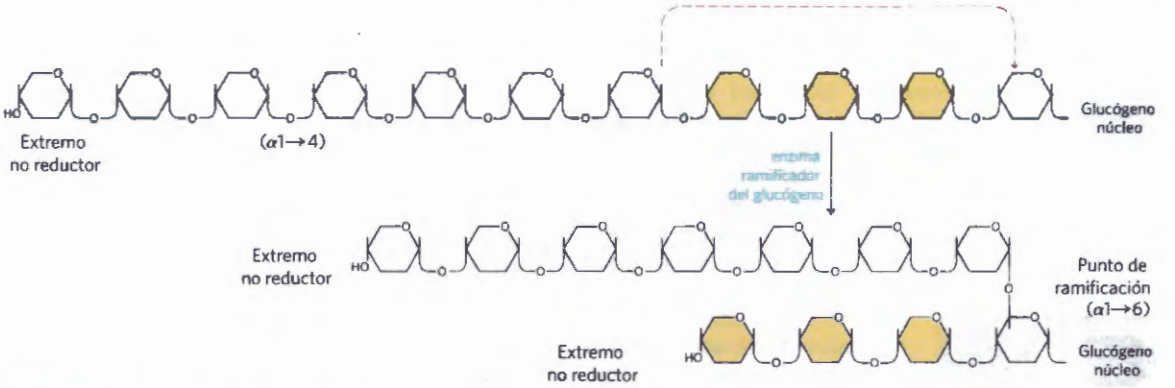


FIGURA 15-33 Síntesis de ramificaciones en el glucógeno. El enzima ramificador del glucógeno (también llamado amilo (1→4) a (1→6) transglucosilasa o glucosil-(4→6)-transferasa) forma un nuevo punto de ramificación durante la síntesis del glucógeno.

una mutación en el gen de la glucogenina que suprime la actividad polimerizante de la proteína.

RESUMEN 15.4 Metabolismo del glucógeno en animales

- El glucógeno se almacena en el músculo y en el hígado en forma de grandes partículas insolubles que contribuyen de manera insignificante a la osmolaridad del citosol. Dentro de las partículas se encuentran los enzimas que metabolizan el glucógeno así como los enzimas reguladores.
- La glucógeno fosforilasa cataliza la escisión fosforolítica en los extremos no reductores de las cadenas de glucógeno con producción de glucosa 1-fosfato. El enzima desramificante transfiere ramas a las cadenas principales y libera el residuo del punto de ramificación (α1→6) en forma de glucosa libre.
- La fosfoglucomutasa interconvierte glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato. La glucosa 6-fosfato puede entrar en la glucólisis o, en el hígado, puede convertirse en glucosa libre por acción de la glucosa 6-fosfatasa del retículo endoplasmático siendo a continuación liberada para reponer la glucosa sanguínea.
- El nucleótido-azúcar UDP-glucosa dona residuos de glucosa al extremo no reductor del glucógeno en la reacción catalizada por la glucógeno sintasa. Un enzima ramificador diferente produce los enlaces (α1→6) de los puntos de ramificación.
- Las nuevas partículas de glucógeno se inician con la formación autocatalítica de un enlace glucosídico entre la glucosa de la UDP-glucosa y un residuo Tyr de la proteína glucogenina, seguida de la adición de varios residuos de glucosa para formar un cebador sobre el que ya puede actuar la glucógeno sintasa.

15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno

Tal como ya hemos visto la movilización del glucógeno almacenado se consigue gracias a la glucógeno fosforilasa que degrada el glucógeno a glucosa 1-fosfato (Fig. 15-27). La glucógeno fosforilasa es un caso especialmente instructivo de regulación enzimática. Fue uno de los primeros ejemplos conocidos de un enzima regulado alostéricamente y el primer enzima del que se demostró que estaba regulado por fosforilación reversible. También fue uno de los primeros enzimas alostéricos del que se obtuvieron las estructuras tridimensionales de las formas activa e inactiva mediante estudios cristalográficos por rayos X. La glucógeno fosforilasa también ilustra sobre cómo los isozimas juegan sus papeles con especificidad de tejido.

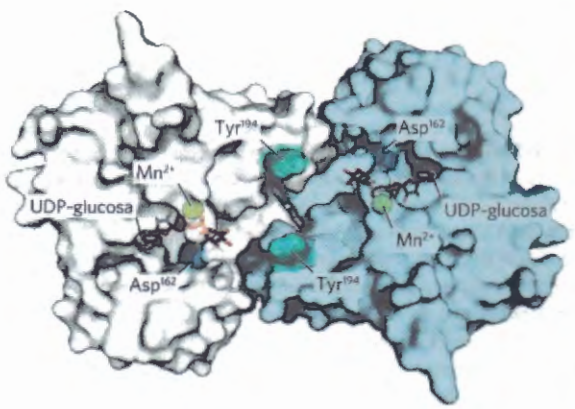


FIGURA 15-34 Estructura de la glucogenina. La glucogenina muscular (M_r 37.000) forma dímeros en solución. En la especie humana se encuentra una segunda isoforma en el hígado, glucogenina-2. El sustrato, UDP-glucosa está unido a un pliegue de Rosmann cerca del extremo amino y a cierta distancia de los residuos Tyr^{194}, 15Å de la Tyr del mismo monómero, 12Å de la Tyr que se encuentra en la otra subunidad. Cada UDP-glucosa está unida a través de sus fosfatos a un ión Mn^{2+} que es esencial para la catálisis. Se cree que el Mn^{2+} funciona como aceptor de un par electrónico (ácido de Lewis) que estabiliza el grupo saliente, UDP. El enlace glucosídico del producto tiene la misma configuración alrededor del C-1 de la glucosa que el sustrato UDP-glucosa, lo que sugiere que la transferencia de glucosa desde el UDP a la Tyr^{194} tiene lugar en dos pasos. El primer paso es, probablemente, un ataque nucleofílico por el Asp^{162} que forma un intermedio temporal con la configuración invertida. Un segundo ataque nucleofílico por la Tyr^{194} restablece la configuración inicial. [Fuente: PDB 1D 1LL2. B. J. Gibbons et al., *J. Mol. Biol.* 319:463, 2002.]

La glucogéno fosforilasa está sujeta a control alostérico y hormonal

A finales de la década de 1930, Carl y Gerty Cori (Recuadro 15-4) descubrieron que la glucógeno fosforilasa del músculo esquelético se presenta en dos formas interconvertibles: una forma catalíticamente activa, la **glucógeno fosforilasa *a***, y la **glucógeno fosforilasa *b***, que es menos activa **(Fig. 15-36)**. Estudios posteriores realizados por Earl Sutherland mostraron que la fosforilasa *b* predomina en el músculo en reposo, pero durante el ejercicio vigoroso la adrenalina desencadena la fosforilación de un residuo Ser específico de la fosforilasa *b*, convirtiéndola en la forma más activa fosforilasa *a*. (Obsérvese que la glucógeno fosforilasa se denomina a menudo simplemente fosforilasa, honor que se debe al hecho de que fue la primera fosforilasa descubierta; el nombre abreviado ha persistido tanto en el uso común como en la bibliografía).



Earl W. Sutherland, Jr., 1915–1974 [Fuente: Science Source.]

El enzima (fosforilasa *b* quinasa) responsable de la activación de la fosforilasa mediante la transferencia de un grupo fosforilo a su residuo Ser está asimismo activada por la adrenalina o el glucagón a través de una serie de pasos que se muestran en la **Figura 15-37**. Sutherland descubrió el segundo mensajero cAMP, que aumenta su concentración en respuesta a la estimulación por adrenalina (en el músculo) o por glucagón (en el hígado). La elevada [cAMP] inicia una **cascada enzimática**, en la que un catalizador activa un catalizador el cual activa otro catalizador (véase la Sección 12.2). Tales cascadas permiten una gran amplificación de la señal inicial (véanse los recuadros rosas de la Fig. 15-37). El aumento en la [cAMP] activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). A continuación la PKA fosforila y activa a la **fosforilasa *b* quinasa,** que cataliza la fosforilación de residuos Ser en cada una de las dos subunidades idénticas de la glucógeno fosforilasa activándola con lo que, de este modo, se estimula la degradación del glucógeno. En el músculo esto proporciona combustible para que la glucólisis mantenga la contracción muscular para la respuesta de luchar o huir señalada por la adrenalina. En el hígado, la degradación del glucógeno combate la baja concentración de glucosa sanguínea señalada por el glucagón, liberando glucosa a la sangre. Estos

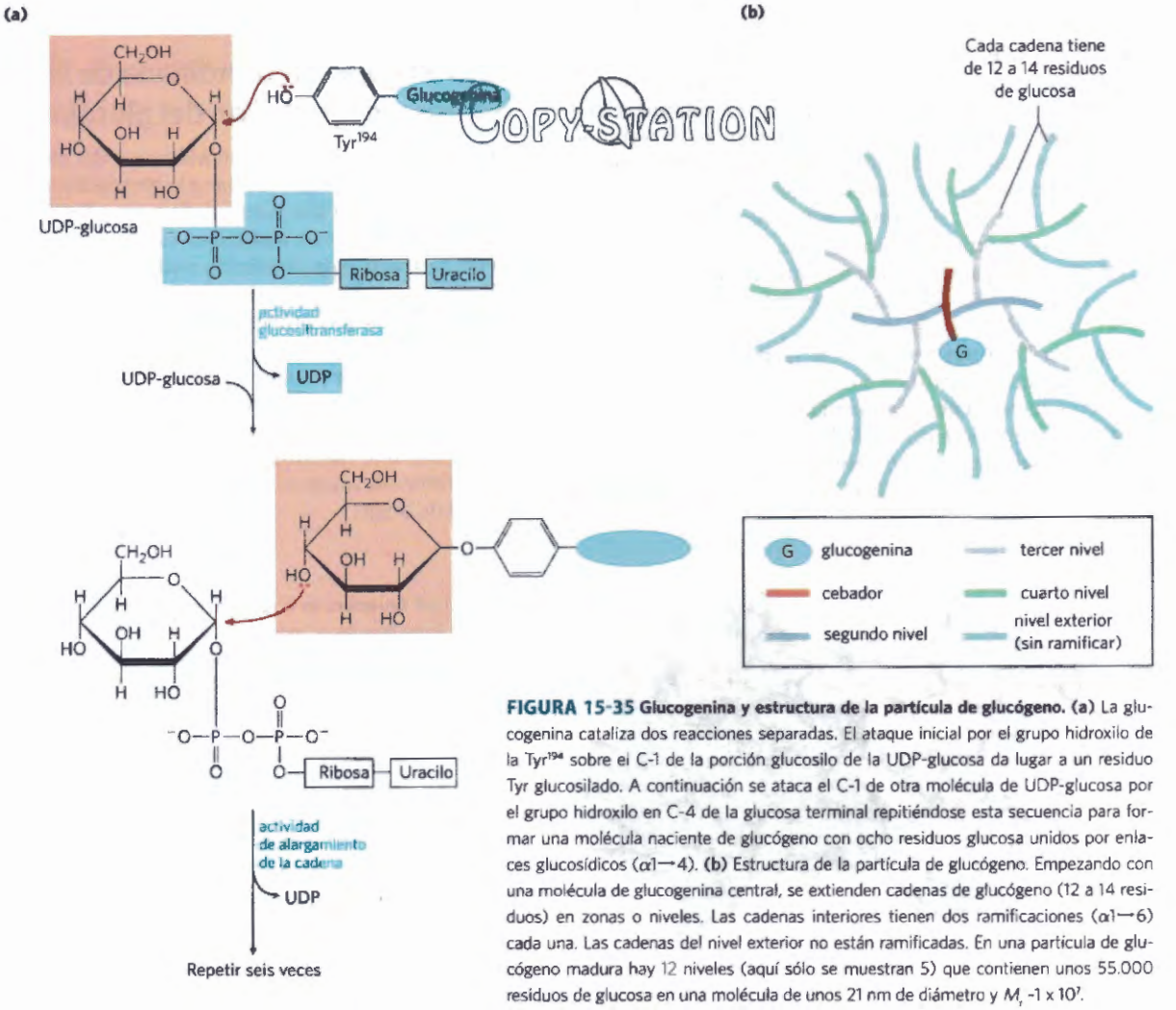


FIGURA 15-35 Glucogenina y estructura de la partícula de glucógeno. (a) La glucogenina cataliza dos reacciones separadas. El ataque inicial por el grupo hidroxilo de la Tyr^{194} sobre el C-1 de la porción glucosilo de la UDP-glucosa da lugar a un residuo Tyr glucosilado. A continuación se ataca el C-1 de otra molécula de UDP-glucosa por el grupo hidroxilo en C-4 de la glucosa terminal repitiéndose esta secuencia para formar una molécula naciente de glucógeno con ocho residuos glucosa unidos por enlaces glucosídicos ($\alpha 1 \rightarrow 4$). **(b)** Estructura de la partícula de glucógeno. Empezando con una molécula de glucogenina central, se extienden cadenas de glucógeno (12 a 14 residuos) en zonas o niveles. Las cadenas interiores tienen dos ramificaciones ($\alpha 1 \rightarrow 6$) cada una. Las cadenas del nivel exterior no están ramificadas. En una partícula de glucógeno madura hay 12 niveles (aquí sólo se muestran 5) que contienen unos 55.000 residuos de glucosa en una molécula de unos 21 nm de diámetro y M_r ~1 x 10^7.

papeles diferentes quedan reflejados en diferencias sutiles de los mecanismos de regulación en el músculo y en el hígado. Las glucógeno fosforilasas de hígado y de músculo son isozimas codificados por genes diferentes y que difieren en sus propiedades reguladoras.

En el músculo, además de la regulación de la fosforilasa mediante la modificación covalente existen dos mecanismos de control alostéricos (Fig. 15-37). El Ca^{2+}, la señal para la contracción muscular, se une a la fosforilasa *b* quinasa y la activa, provocando la conversión de la fosforilasa *b* en la forma *a* activa. El Ca^{2+} se une a la fosforilasa *b* quinasa a través de su subunidad *δ*, que es la calmodulina (véase la Fig. 12-12). El AMP, que se acumula durante el ejercicio muscular vigoroso como consecuencia de la degradación del ATP, se une a la fosforilasa activándola y acelerando la liberación de glucosa 1-fosfato a partir del glucógeno. Cuando los niveles de ATP son los adecuados, el ATP bloquea el sitio alostérico al que se une el AMP, inactivando a la fosforilasa.

Cuando el músculo vuelve al reposo, un segundo enzima, **fosforilasa *a* fosfatasa**, también denominado **fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1),** elimina los grupos fosforilo de la fosforilasa *a*, convirtiéndola en la forma menos activa, fosforilasa *b*.

Al igual que el enzima muscular, la glucógeno fosforilasa hepática está regulada hormonalmente (por fosfo-

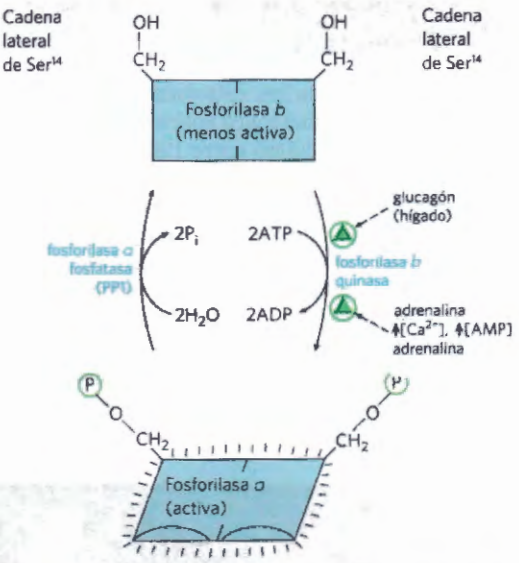


FIGURA 15-36 Regulación de la glucógeno fosforilasa de músculo por modificación covalente. En la forma más activa del enzima, fosforilasa *a*, los residuos Ser^{14}, uno en cada subunidad, están fosforilados. La fosforilasa *a* se convierte en la forma menos activa, fosforilasa *b*, por pérdida enzimática de estos grupos fosforilo, catalizada por la fosforilasa *a* fosfatasa (también conocida como fosfoproteína fosfatasa 1, PP1). La fosforilasa *b* se puede reconvertir (reactivar) a fosforilasa *a* por acción de la fosforilasa *b* quinasa. (Véase también la Fig. 6-42 sobre la regulación de la glucógeno fosforilasa).

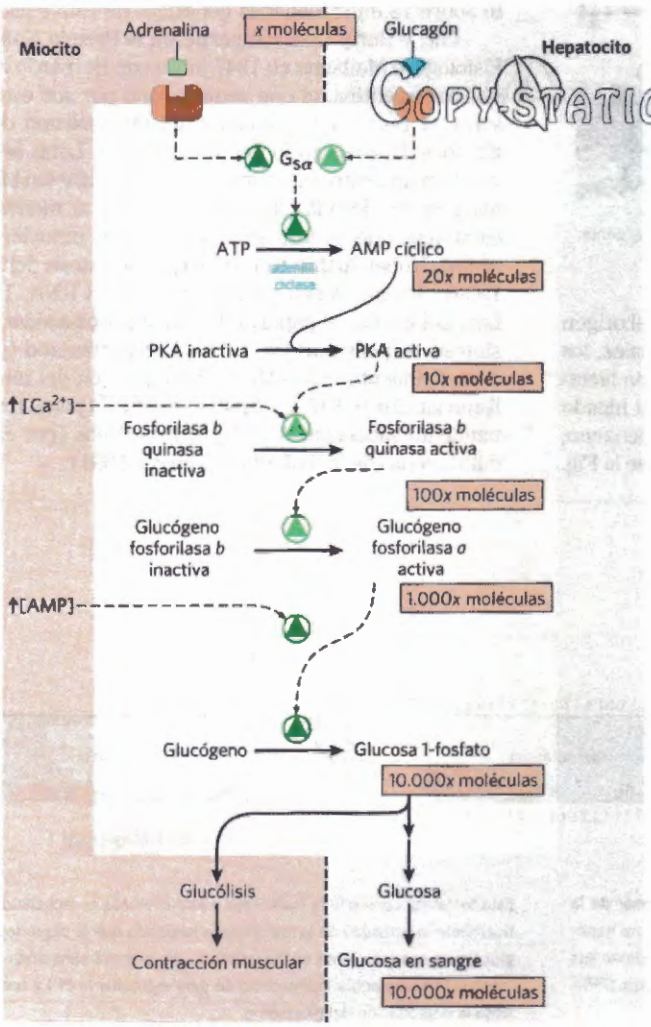


FIGURA 15-37 Mecanismo de cascada de la acción de la adrenalina y del glucagón. Al unirse a receptores de superficie específicos, tanto la adrenalina que actúa sobre un miocito (izquierda) como el glucagón que actúa sobre un hepatocito (derecha) activan un proteína fijadora de GTP, la $G_{s\alpha}$ (véase la Fig. 12-7). La $G_{s\alpha}$ activa provoca un aumento en la [cAMP], que activa la PKA. Esto pone en marcha una cascada de fosforilaciones; la PKA activa la fosforilasa *b* quinasa, la cual activa entonces la glucógeno fosforilasa. Tales cascadas efectúan una gran amplificación de la señal inicial; las cifras en los recuadros rosas son probablemente estimaciones bajas del incremento real en el número de moléculas en cada paso de la cascada. La degradación resultante del glucógeno proporciona glucosa, que en el miocito puede suministrar ATP (vía glucólisis) para la contracción muscular y en el hepatocito se libera a la sangre para contrarrestar la baja concentración de glucosa en la misma.

RECUADRO 15-4 Carl y Gerty Cori: Pioneros del metabolismo y enfermedades del glucógeno

Gran parte de lo que está escrito en los actuales libros de texto de Bioquímica sobre el metabolismo del glucógeno se descubrió entre 1925 y 1950 por el notable equipo matrimonial de Carl F. Cori y Gerty T. Cori. Ambos se formaron en medicina en Europa al final de la 1ª Guerra Mundial (ella completó los estudios premédicos y la Facultad de Medicina en ¡un año!). Abandonaron Europa en 1922 para establecer laboratorios de investigación en los Estados Unidos, primero durante nueve años en Buffalo, Nueva York, en lo que es ahora el Roswell Park Memorial Institute, y después a partir de 1931 hasta el final de sus vidas en la Washington University de St. Louis.



El matrimonio Coris en el Gerty Cori's laboratory, hacia 1947. [Fuente: AP Photo.]

En sus estudios fisiológicos iniciales sobre el origen y destino del glucógeno en el músculo de animales, los Cori demostraron la conversión del glucógeno en lactato en tejidos, el paso del lactato de la sangre al hígado y, en el hígado, la reconversión del lactato en glucógeno, una ruta que se conoce como ciclo de Cori (véase la Fig. 23-21). Continuando con estas investigaciones a nivel bioquímico demostraron que el glucógeno se movilizaba mediante una reacción de fosforólisis catalizada por el enzima descubierto por ellos, la glucógeno fosforilasa. Identificaron el producto de esta reacción (el "éster de Cori") como glucosa 1-fosfato y demostraron que se podía reincorporar al glucógeno mediante la reacción inversa. Aunque esto no demostró que fuese ésta la reacción mediante la que se sintetiza el glucógeno en las células fue la primera demostración in vitro de la síntesis de una macromolécula a partir de subunidades monoméricas sencillas lo que inspiró a otros investigadores en la búsqueda de enzimas polimerizadores. Arthur Kornberg, descubridor de la primera DNA polimerasa dijo de esta experiencia en el laboratorio de los Cori, "la glucógeno fosforilasa, no el apareamiento de bases, fue lo que me llevó a la DNA polimerasa".

Gerty Cori se interesó más adelante por las enfermedades genéticas humanas en las que se almacena demasiado glucógeno en el hígado. Identificó el defecto bioquímico de varias de estas enfermedades y demostró que se pueden diagnosticar mediante ensayos de los enzimas del metabolismo del glucógeno en pequeñas muestras de tejido obtenidas por biopsia. En la Tabla 1 se resume lo que conocemos actualmente sobre 13 enfermedades genéticas de esta clase. ■

Carl y Gerty Cori compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1947 junto con Bernardo Houssay de Argentina, al que se mencionó por sus estudios sobre la regulación hormonal del metabolismo de los glúcidos. El laboratorio de los Cori en St. Louis se convirtió en un centro internacional de investigación bioquímica en las décadas de 1940 y 1950, y al menos seis científicos que se formaron con los Cori obtuvieron el premio Nobel: Arthur Kornberg (por la síntesis del DNA, 1959), Severo Ochoa (por la síntesis del RNA, 1959), Luís Leloir (por el papel de los nucleótidos-azúcar en la síntesis de polisacáridos, 1970), Earl Sutherland (por el descubrimiento del cAMP en la regulación del metabolismo glucídico, 1971), Christian de Duve (por el fraccionamiento subcelular, 1974) y Edwin Krebs (por el descubrimiento de la fosforilasa quinasa, 1991).

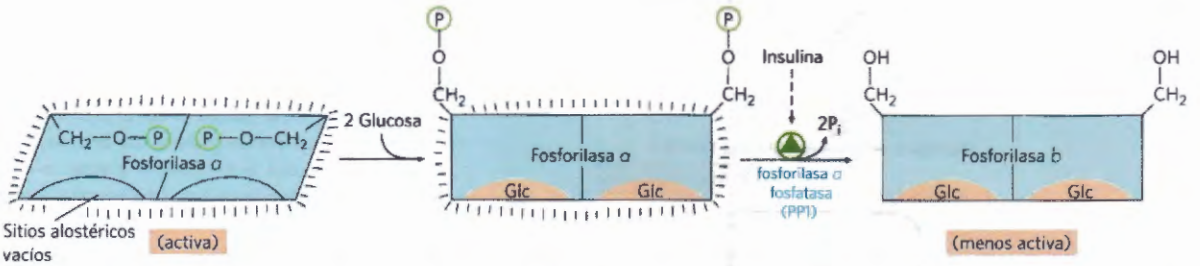


FIGURA 15-38 La glucógeno fosforilasa hepática es un sensor de la glucosa. La fijación de la glucosa a un sitio alostérico del isozima hepático de la fosforilasa *a* induce un cambio conformacional que expone sus residuos Ser fosforilados a la acción de la fosforilasa *a* fosfatasa (PP1). Esta fosfatasa convierte la fosforilasa *a* en fosforilasa *b*, reduciendo drásticamente la actividad de la fosforilasa y haciendo que la degradación del glucógeno sea más lenta en respuesta a una glucosa sanguínea alta. La insulina también actúa indirectamente para estimular la PP1 y hacer más lenta la degradación del glucógeno.

TABLA 1 Enfermedades del almacenamiento del glucógeno en el hombre

Tipo (nombre)	Enzima afectado	Órgano primario afectado	Síntomas
Tipo 0	Glucógeno sintasa	Hígado	Baja glucosa sanguínea, cuerpos cetónicos elevados, muerte temprana
Tipo Ia (de von Gierke)	Glucosa 6-fosfatasa	Hígado	Hepatomegalia, fallo renal
11a Tipo Ib	Glucosa 6-fosfato translocasa microsómica	Hígado	Como en el tipo Ia; también susceptibilidad elevada a infecciones bacterianas
Tipo Ic	Transportador microsómico de P_i	Hígado	Como en el tipo Ia
Tipo II (de Pompe)	Glucosidasa lisosómica	Músculos esquelético y cardíaco	Forma infantil: muerte a la edad de 2 años; forma juvenil: defectos musculares (miopatía); forma adulta: como en la distrofia muscular
Tipo IIIa (de Cori o de Forbes)	Enzima desramificador	Hígado, músculos esquelético y cardíaco	Hepatomegalia en los recién nacidos; miopatía
Tipo IIIb	Enzima desramificador hepático (enzima muscular normal)	Hígado	Hepatomegalia en recién nacidos
Tipo IV (de Andersen)	Enzima ramificante	Hígado, músculo esquelético	Hepato y esplenomegalia, mioglobina en la orina
Tipo V (de McArdle)	Fosforilasa muscular	Músculo esquelético	Rampas inducidas por el ejercicio y dolor; mioglobina en orina
Tipo VI (de Hers)	Fosforilasa hepática	Hígado	Hepatomegalia
Tipo VII (de Tarui)	PFK-1 muscular	Músculo, eritrocitos	Como en tipo V; también anemia hemolítica
Tipo VIb, VIII o IX	Fosforilasa quinasa	Hígado, leucocitos, músculo	Hepatomegalia
Tipo XI (Fanconi-Bickel)	Transportador de glucosa (GLUT2)	Hígado	Desarrollo impedido, hepatomegalia, raquitismo, disfunción renal

COPYSTATION

rilación/desfosforilación) y alostéricamente. La forma desfosforilada es prácticamente inactiva. Cuando los niveles de glucosa en sangre son demasiado bajos el glucagón (mediante el mismo mecanismo de cascada mostrado en la Fig. 15-37) activa la fosforilasa *b* quinasa, que, a su vez, convierte la fosforilasa *b* en su forma *a* activa, iniciando la liberación de glucosa a la sangre. Cuando los niveles de glucosa en sangre vuelven a la normalidad, la glucosa entra en los hepatocitos y se une a un sitio alostérico inhibidor de la fosforilasa *a*. Esta unión también produce un cambio de conformación que expone los residuos Ser fosforilados a la PP1, que cataliza su desfosforilación e inactiva la fosforilasa **(Fig. 15-38)**. El sitio alostérico para la glucosa permite que la glucógeno fosforilasa hepática actúe como su propio sensor de glucosa y que responda adecuadamente a cambios en la concentración de glucosa sanguínea.

La glucógeno sintasa también está regulada por fosforilación y desfosforilación

Al igual que la glucógeno fosforilasa la glucógeno sintasa puede existir en las formas fosforilada y desfosforilada **(Fig. 15-39)**. Su forma activa, **glucógeno sintasa *a*,** está sin fosforilar. La fosforilación de los hidroxilos de las cadenas laterales de varios residuos Ser de ambas subunidades transforma la glucógeno sintasa *a* en la **glucógeno sintasa *b*,** que es inactiva a menos que esté presente su activador alostérico glucosa 6-fosfato. La glucógeno sintasa es notable por su capacidad de ser fosforilada en varios residuos por al menos 11 proteína quinasas diferentes. La quinasa reguladora más importante es la **glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3),** que añade grupos fosforilo a tres residuos Ser cerca del carboxilo terminal de la glucógeno sintasa, lo que pro-

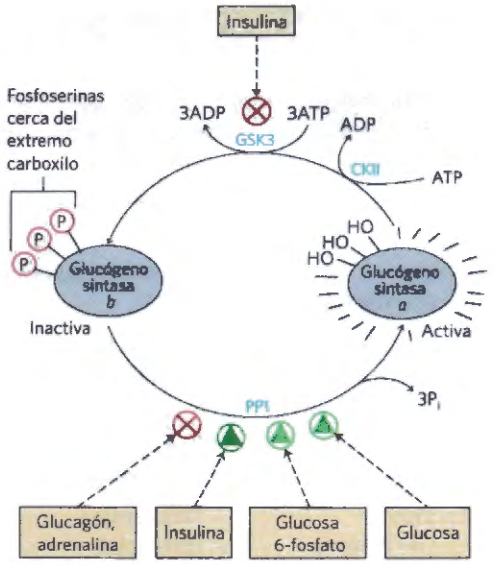


FIGURA 15-39 Efectos de GSK3 sobre la actividad glucógeno sintasa. La glucógeno sintasa *a*, la forma activa, tiene tres residuos Ser cerca de su extremo carboxilo que son fosforilados por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Esto convierte la glucógeno sintasa en la forma inactiva (*b*). La acción de la GSK3 requiere una fosforilación previa (cebado) por la caseína quinasa (CKII). La insulina desencadena la activación de la glucógeno sintasa *b* bloqueando la actividad de la GSK3 (véase la ruta de esta acción en la Fig. 12-20) y activando una fosfoproteína fosfatasa (PP1). En el músculo la adrenalina activa la PKA, que fosforila la proteína señalizadora del glucógeno G$_M$ (véase la Fig 15-42) en un sitio que produce la disociación de la PP1 del glucógeno. La glucosa 6-fosfato favorece la desfosforilación de la glucógeno sintasa al unirse a ella y promover una conformación que es un buen sustrato de la PP1. La glucosa también provoca la desfosforilación; la unión de glucosa a la glucógeno fosforilasa *a* fuerza un cambio de conformación que favorece la desfosforilación a glucógeno fosforilasa *b*, permitiendo así la acción de la PP1 (véase la Fig. 15-41).

duce una fuerte inactivación. La acción de la GSK3 es jerárquica; no puede fosforilar la glucógeno sintasa hasta que otra proteína quinasa, la **caseína quinasa 2 (CKII),** ha fosforilado primero la glucógeno sintasa en un residuo cercano, hecho que se denomina **cebado (Fig. 15-40a)**. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que se asocia con los gránulos de glucógeno a través de su dominio de fijación de glúcido, también fosforila la glucógeno sintasa inhibiendo la síntesis de glucógeno durante períodos de estrés metabólico.

En el hígado la conversión de la glucógeno sintasa *b* a la forma activa está promovida por la PP1, la cual está unida a la partícula de glucógeno por G$_L$, una subunidad de PP1. La PP1 elimina los grupos fosforilo de los tres residuos de Ser fosforilados por la GSK3. La glucosa 6-fosfato se une a un sitio alostérico de la glucógeno sintasa *b* con lo que consigue que el enzima sea un sustrato mejor para la desfosforilación por la PP1 consiguiendo así su activación. Por analogía con la glucógeno fosforilasa, que actúa como un sensor de glucosa, se puede considerar a la glucógeno sintasa como un sensor de glucosa 6-fosfato. En el músculo, una fosfatasa diferente podría tener el papel desempeñado por la PP1 en el hígado, activando la glucógeno sintasa por desfosforilación.

COPY STATION

La glucógeno sintasa quinasa 3 interviene en algunas acciones de la insulina

Tal como se vio en el Capítulo 12, una de las vías mediante las que la insulina desencadena cambios intracelulares es la activación de una proteína quinasa (PKB) que,

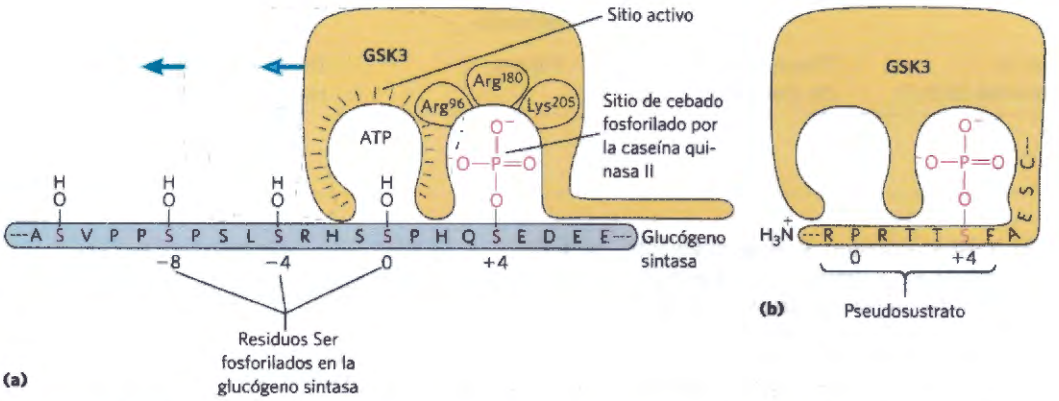


FIGURA 15-40 Cebado de la fosforilación de la glucógeno sintasa por la GSK3. (a) La glucógeno sintasa quinasa 3 se asocia primeramente con su sustrato (glucógeno sintasa) mediante la interacción entre tres residuos cargados positivamente (Arg^{96}, Arg^{180}, Lys^{205}) y un residuo fosfoserina en la posición +4 del sustrato. (Para orientación, al residuo Ser o Thr que se ha de fosforilar en el sustrato se le asigna el índice 0. Los residuos del lado amino terminal de este residuo se numeran -1, -2, y así sucesivamente; los residuos sobre el lado carboxi terminal se numeran +1, +2, etc.). Esta asociación alinea el sitio activo del enzima con un residuo Ser en la posición 0, al que fosforila. Esto crea un nuevo sitio de cebado y el enzima se desplaza por la proteína para fosforilar el residuo Ser en la posición -4 y a continuación la Ser en -8. **(b)** La GSK3 tiene un residuo Ser cerca de su extremo amino que puede ser fosforilado por la PKA o por la PKB (véase la Fig. 15-41). Esto produce una región "pseudosustrato" en GSK3 que se pliega dando un sitio cebador que hace que el sitio activo sea inaccesible a otra proteína sustrato, inhibiendo la GSK3 hasta que el grupo fosforilo de cebado de su región pseudosustrato es eliminado por la PP1. Otras proteínas que son sustrato de la GSK3 también tienen un sitio de cebado en la posición +4, que ha de ser fosforilado por otra proteína quinasa antes de que la GSK3 pueda actuar sobre ellas. (Véanse también las Figs. 6-38 y 12-25b sobre la regulación de la glucógeno sintasa).

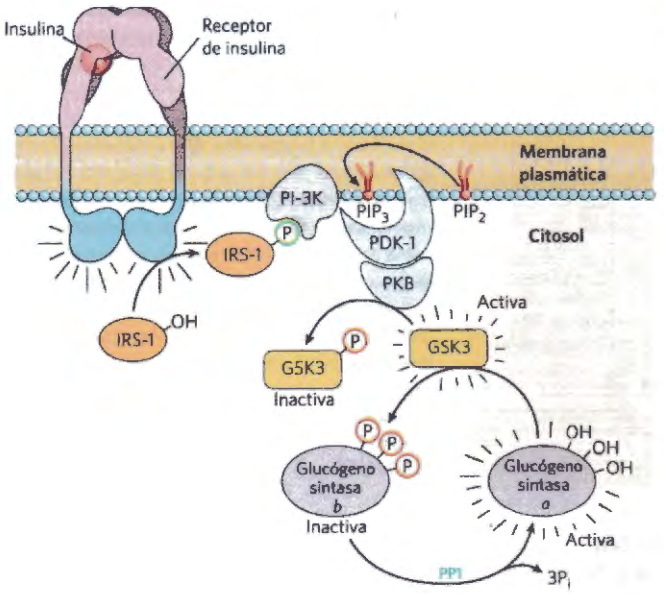


FIGURA 15-41 Ruta desde la insulina a la GSK3 y a la glucógeno sintasa. La unión de la insulina a su receptor activa una tirosina proteína quinasa en el receptor, la cual fosforila el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1). A continuación la fosfotirosina de esta proteína se une a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) que convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) de la membrana en fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3). Una proteína quinasa (PDK-1) que es activada por la unión de PIP_3 activa una segunda proteína quinasa (PKB) la cual fosforila la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) en su región pseudosustrato inactivándola mediante el mecanismo que se muestra en la Figura 15-40b. La inactivación de la GSK3 permite que la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) desfosforile la glucógeno sintasa, convirtiéndola en su forma activa. De esta forma, la insulina estimula la síntesis de glucógeno. (Véase la Fig. 12-20 para más detalles sobre la acción de la insulina).

a su vez, fosforila e inactiva la GSK3 (**Fig. 15-41**; véase también la Fig. 12-20). La fosforilación de un residuo Ser cerca del extremo amino de la GSK3 convierte esa región de la proteína en un pseudosustrato que se pliega en el sitio activo donde normalmente debería unirse el residuo Ser fosforilado que actúa como cebador (Fig. 15-40b). Esto impide que la GSK3 se una al sitio de cebado de un sustrato real, inactivando así el enzima y desplazando el equilibrio a favor de la desfosforilación de la glucógeno sintasa por la PP1. La glucógeno fosforilasa también puede afectar a la fosforilación de la glucógeno sintasa: la glucógeno fosforilasa activa inhibe directamente la PP1, impidiendo que active la glucógeno sintasa (Fig. 15-39).

Aunque la primera función que se descubrió de la GSK3 fue en el metabolismo del glucógeno (de ahí el nombre de glucógeno sintasa quinasa), este enzima tiene claramente un papel más amplio que el de la regulación de la glucógeno sintasa. Interviene en la transmisión de señales de la insulina y otros factores de crecimiento y nutrientes y actúa en la especificación de los destinos celulares durante el desarrollo embrionario. Entre sus dianas se encuentran proteínas del citoesqueleto y proteínas esenciales para la síntesis de mRNA y de proteínas. Estas dianas, lo mismo que la glucógeno sintasa, han de experimentar previamente una fosforilación cebadora por otra proteína quinasa antes de que puedan ser fosforiladas por la GSK3.

La fosfoproteína fosfatasa 1 es clave para el metabolismo del glucógeno

Un solo enzima, la PP1, puede eliminar grupos fosforilo de los tres enzimas fosforilados como respuesta al glucagón (hígado) y a la adrenalina (hígado y músculo): fosforilasa quinasa, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa. La insulina estimula la síntesis de glucógeno al activar la PP1 e inactivar la GSK3.

La subunidad catalítica de la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1c) no se encuentra libre en el citosol, sino que está fuertemente unida a sus proteínas diana por un miembro de una familia de **proteínas de señalización del glucógeno (glycogen-targeting proteins)** que unen el glucógeno y cada uno de los tres enzimas glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa y glucógeno sintasa (**Fig. 15-42**). La propia PP1 también está sujeta a regulación covalente y alostérica; se inactiva cuando es fosforilada por la PKA y se activa alostéricamente por la glucosa 6-fosfato.

CopyStation

El metabolismo glucídico está globalmente coordinado por señales alostéricas y hormonales

Una vez analizados los mecanismos que regulan los enzimas individuales, podemos considerar ahora los desplazamientos globales del metabolismo glucídico que tienen lugar en el estado de buena alimentación, durante el ayuno y en la respuesta de luchar o huir señaladas por la insulina, el glucagón y la adrenalina, respectivamente. Hemos de comparar dos casos en los que la regulación tiene objetivos diferentes: (1) el papel de los hepatocitos en el suministro de glucosa a la sangre y (2) la utilización egoísta de combustibles glucídicos por tejidos no hepáticos, tipificados por el músculo esquelético (miocitos), para sostener sus propias actividades.

Después de la ingestión de una comida rica en glúcidos, la elevación de la glucosa sanguínea desencadena la liberación de insulina (**Fig. 15-43**, parte superior). En un hepatocito, la insulina tiene dos efectos inmediatos: inactiva la GSK3, a través de la cascada mostrada en la Figura 15-41 e inactiva una proteína fosfatasa, quizás la PP1. Estas dos acciones activan completamente la glucógeno sintasa. La PP1 también inactiva la glucógeno fosforilasa *a* y la fosforilasa quinasa por desfosforilación de ambas, deteniendo así de manera efectiva la degradación del glucógeno. La glucosa entra en el hepatocito a través del transportador de alta capacidad GLUT2, siempre presente en la membrana plasmática, y la elevada concentración intracelular de glucosa conduce a la disociación de la hexoquinasa IV (glucoquinasa) de su proteína reguladora nuclear (Fig. 15-15). La hexoquina-

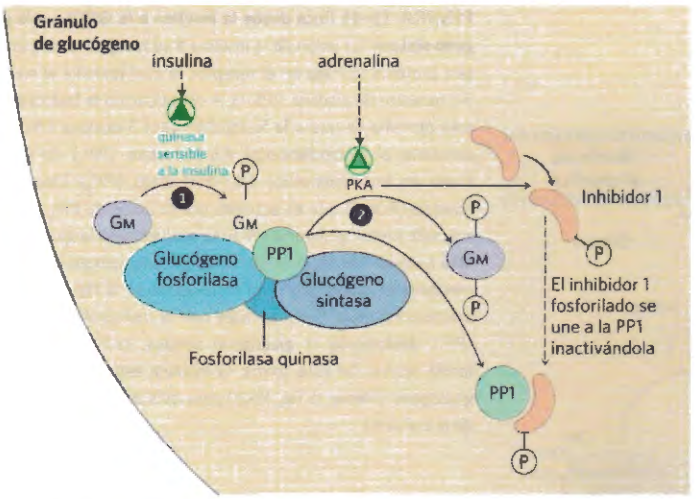


FIGURA 15-42 Proteína GM de señalización del glucógeno. La proteína de señalización del glucógeno GM forma parte de una familia de proteínas que unen otras proteínas (incluida la PP1) a las partículas de glucógeno. La GM se puede fosforilar en dos posiciones diferentes en respuesta a la insulina o a la adrenalina. ❶ La fosforilación estimulada por insulina del sitio 1 de la GM activa la PP1, la cual desfosforila la fosforilasa quinasa, la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa ❷. La fosforilación estimulada por la adrenalina del sitio 2 de la GM produce la disociación de la PP1 de la partícula de glucógeno, impidiendo su acceso a la glucógeno fosforilasa y a la glucógeno sintasa. La PKA también fosforila una proteína (inhibidor 1) que, cuando está fosforilada, inhibe la PP1. De este modo la insulina inhibe la degradación del glucógeno y estimula su síntesis, mientras que la adrenalina (o el glucagón en el hígado) tiene el efecto opuesto.

sa IV entra en el citosol y fosforila la glucosa estimulando la glucólisis y suministrando el precursor para la síntesis de glucógeno. En estas condiciones, los hepatocitos utilizan el exceso de glucosa de la sangre para sintetizar glucógeno hasta el límite de aproximadamente 10% del peso total del hígado.

Entre comidas, o durante un ayuno prolongado, la disminución de la glucosa sanguínea provoca la liberación de glucagón, el cual, a través de la cascada mostrada en la Figura 15-37, activa la PKA. Ésta interviene en todos los efectos del glucagón (Figura 15-43, parte inferior). Fosforila la fosforilasa quinasa activándola lo que lleva a la activación de la glucógeno fosforilasa. Fosforila la glucógeno sintasa inactivándola y bloquea, por tanto, la síntesis de glucógeno. Fosforila la PFK-2/FBPasa-2, lo que lleva a la disminución de la concentración del regulador fructosa 2,6-bisfosfato, lo que tiene como efecto la inactivación del enzima glucolítico PFK-1 y la activación del enzima gluconeogénico FBPasa-1. Finalmente también fosforila e inactiva el enzima glucolítico piruvato quinasa. En estas condiciones, el hígado produce glucosa 6-fosfato por degradación del glucógeno y por gluconeogénesis y deja de utilizar glucosa para alimentar la glucólisis o producir glucógeno con lo que se maximiza la cantidad de glucosa que se libera a la sangre. Esta liberación de glucosa sólo es posible en el hígado ya que los demás tejidos carecen de glucosa 6-fosfatasa (Fig. 15-30).

La fisiología del músculo esquelético difiere de la del hígado en tres aspectos que son importantes para nuestra discusión sobre la regulación metabólica **(Fig. 15-44)**: (1) el músculo utiliza su glucógeno almacenado solamente para sus propias necesidades; (2) cuando pasa del reposo a la contracción vigorosa, el músculo experimenta grandes variaciones en la demanda de ATP, que son proporcionadas por la glucólisis; (3) el músculo carece de la dotación enzimática para la gluconeogénesis. La regulación del metabolismo glucí-

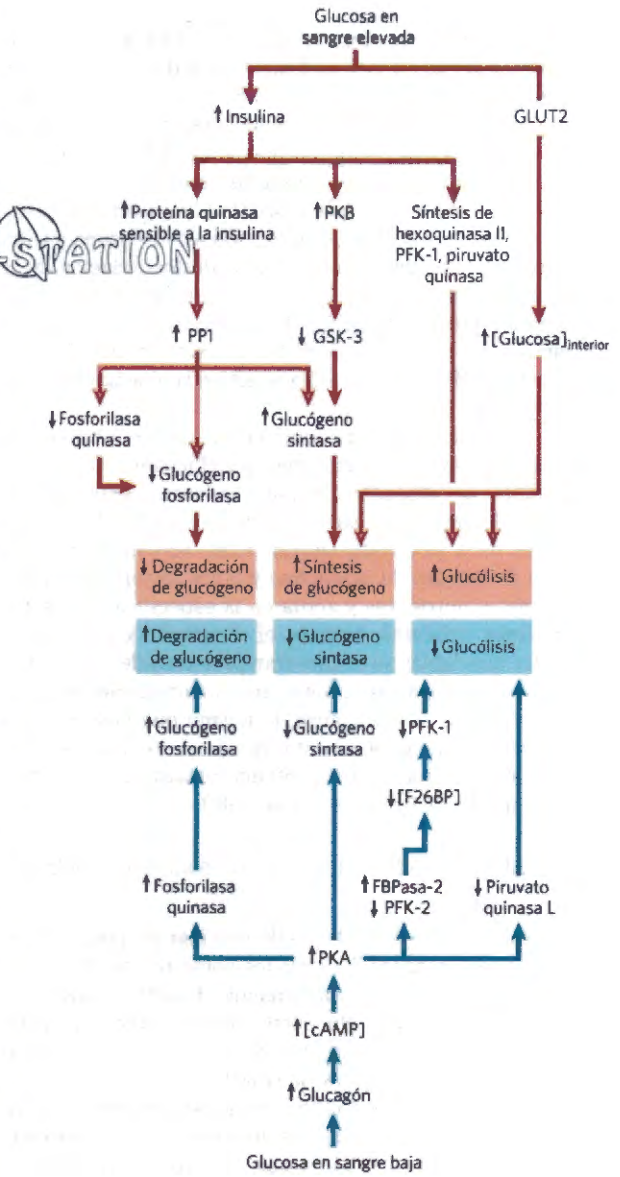


FIGURA 15-43 Regulación del metabolismo glucídico en el hígado. Las flechas indican las relaciones causales entre los cambios que conectan. Por ejemplo, una flecha de ↓A a ↑B indica que un descenso de A produce un incremento de B. Las flechas rojas conectan efectos resultantes de una elevada glucosa sanguínea; las flechas azules conectan los efectos resultantes de una baja glucosa sanguínea.

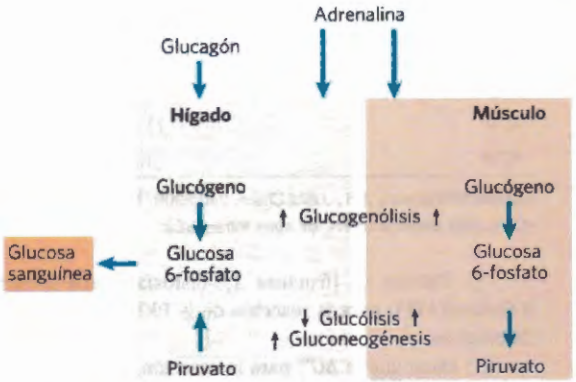


FIGURA 15-44 Diferencias en la regulación del metabolismo glucídico en hígado y músculo. En el hígado tanto el glucagón (que indica baja glucosa sanguínea) como la adrenalina (que señala la necesidad de luchar o huir) tienen el efecto de maximizar la salida de glucosa a la sangre. En el músculo, la adrenalina aumenta la degradación del glucógeno y la glucólisis que, conjuntamente, proporcionan combustible para producir el ATP necesario para la contracción muscular.

dico en el músculo refleja estas diferencias respecto del hígado. En primer lugar, los miocitos carecen de receptores para el glucagón. En segundo lugar, el isozima muscular de la piruvato quinasa no es fosforilado por la PKA por lo que no se detiene la glucólisis cuando la [cAMP] es elevada. De hecho, la cAMP *aumenta* la velocidad de la glucólisis en el músculo, probablemente por activación de la glucógeno fosforilasa. Cuando se libera adrenalina a la sangre en una situación de luchar o huir, se activa la PKA por el aumento de la [cAMP] con lo que fosforila y activa la glucógeno fosforilasa quinasa. La fosforilación y activación resultantes de la glucógeno fosforilasa provoca una degradación más rápida del glucógeno. La adrenalina no se libera en condiciones de bajo estrés, pero con cada estimulación neuronal de la contracción muscular, se eleva brevemente la $[Ca^{2+}]$ citosólica que activa la fosforilasa quinasa a través de su subunidad de calmodulina.

La concentración elevada de insulina desencadena un aumento de la síntesis de glucógeno en los miocitos por activación de la PP1 e inactivación de la GSK3. A diferencia de los hepatocitos, los miocitos tienen una reserva de GLUT4 secuestrada en vesículas intracelulares. La insulina provoca su desplazamiento a la membrana plasmática (véase la Fig. 12-20), en donde permiten una mayor captación de glucosa. Por tanto, en respuesta a la insulina, los miocitos ayudan a disminuir la glucosa sanguínea al incrementar sus velocidades de captación de glucosa, de síntesis de glucógeno y de glucólisis.

El metabolismo de glúcidos y de lípidos está integrado mediante mecanismos hormonales y alostéricos

Compleja como es la regulación del metabolismo glucídico no deja de ser sólo una parte del metabolismo energético global. El metabolismo de las grasas y de los ácidos grasos está ligado muy estrechamente al de los glúcidos. Señales hormonales tales como la insulina y cambios en la dieta o en el ejercicio son igualmente importantes en la regulación del metabolismo de las grasas y en su integración con el de los glúcidos. Volveremos a esta integración metabólica global en los mamíferos en el Capítulo 23, después de considerar las rutas metabólicas de las grasas y los aminoácidos (Capítulos 17 y 18). El mensaje que deseamos transmitir aquí es que las rutas metabólicas están sujetas a controles reguladores complejos que son extraordinariamente sensibles a cambios en las circunstancias metabólicas. Estos mecanismos actúan para ajustar el flujo de metabolitos a través de las diversas rutas metabólicas según las necesidades de la célula y el organismo y lo realizan sin producir cambios importantes en las concentraciones de los intermediarios compartidos con otras rutas.

RESUMEN 15.5 Regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno

- La glucógeno fosforilasa se activa en respuesta al glucagón o a la adrenalina, que aumentan la [cAMP] y activan la PKA. Ésta fosforila y activa la fosforilasa quinasa, que transforma la glucógeno fosforilasa *b* en su forma activa *a*. La fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1) invierte la fosforilación de la glucógeno fosforilasa *a*, inactivándola. La glucosa se une al isozima hepático de la glucógeno fosforilasa *a* favoreciendo su desfosforilación e inactivación.
- La glucógeno sintasa *a* es inactivada por fosforilación catalizada por la GSK3. La insulina bloquea la GSK3. La PP1, que es activada por la insulina, invierte la inhibición al desfosforilar la glucógeno sintasa *b*.
- La insulina aumenta la captación de glucosa por los miocitos y adipocitos desencadenando el desplazamiento del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática.
- La insulina estimula la síntesis de las hexoquinasas II y IV, de la PFK-1, de la piruvato quinasa y de varios enzimas implicados en la síntesis de lípidos. La insulina estimula la síntesis de glucógeno en el músculo y en el hígado.
- En el hígado, el glucagón estimula la degradación de glucógeno y la gluconeogénesis al tiempo que bloquea la glucólisis, ahorrando de este modo glucosa para su exportación al cerebro y otros tejidos.
- En el músculo, la adrenalina estimula la degradación del glucógeno y la glucólisis proporcionando ATP para la contracción muscular.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

glucosa 6-fosfato 573
homeostasis 575
diferenciación celular 575
factor de transcripción 575
elemento de respuesta 575
recambio 576
transcriptoma 577
proteoma 577
metaboloma 577
regulación metabólica 578
control metabólico 578
cociente de acción de masas, *Q* 579
adenilato quinasa 580
proteína quinasa activada por AMP (AMPK) 582
coeficiente de control de flujo, *C* 583
flujo, *J* 583

coeficiente
de elasticidad, ε 583
coeficiente
de respuesta, R 585
gluconeogénesis 587
ciclo inútil 587
ciclo de sustrato 587
hexoquinasa II 588
hexoquinasa I 588
hexoquinasa IV
(glucoquinasa) 589
GLUT2 589
glucagón 591
fructosa 2,6-bisfosfato 591
fosfofrutoquinasa-2
(PFK-2) 592
fructosa 2,6-bisfosfatasa
(FBPasa-2) 592
proteína de unión a los
elementos de respuesta
glucídica
(ChREBP) 595
proteína de unión al
elementos reguladores
de los esteroles
(SREBP) 595
proteína de unión al
elemento e respuesta
a cAMP (CREB) 596
forkhead box other
(FOXO1) 5968
glucogenólisis 599
glucogénesis 599
glucosa 1-fosfato 599
enzima desramificante 599
oligo (α1→6) a (α1→4) glu-
canotransferasa 599
fosfoglucomutasa 599
nucleótidos azúcar 600
UDP-gluosa pirofosfori-
lasa 601
amilo (1→4) a (1→6) trans-
glucosilasa 601
glucogenina 602
glucógeno fosforilasa *a* 604
glucógeno fosforilasa *b* 604
cascada enzimática 604
fosforilasa *b* quinasa 604
fosfoproteína fosfatasa 1
(PP1) 605
glucógeno sintasa *a* 607
glucógeno sintasa *b* 607
glucógeno sintasa quinasa 3
(GSK3) 607
caseína quinasa II
(CKII) 608
cebado 608
proteínas de señalización del
glucógeno (glycogen-tar-
geting proteins) 609

COPY-STATION

Problemas

1. Determinación de las concentraciones intracelulares de metabolitos La determinación de las concentraciones de intermediarios metabólicos en una célula viva presenta grandes dificultades experimentales. Normalmente se ha de destruir la célula antes de poder medir las concentraciones de los metabolitos. No obstante, debido a que los enzimas catalizan muy rápidamente las interconversiones metabólicas, un problema común asociado con este tipo de determinaciones es que las concentraciones de metabolitos determinadas no reflejan las concentraciones fisiológicas sino las de equilibrio. Una técnica experimental fiable requiere que todas las reacciones catalizadas enzimáticamente se detengan instantáneamente en el tejido intacto de modo que los intermediarios metabólicos no experimenten cambio alguno. Este objetivo se consigue mediante compresión muy rápida del tejido entre grandes placas de aluminio enfriadas con nitrógeno líquido (–190 °C), proceso denominado **criocompresión** (freeze-clamping). Después de congelar, lo que detiene inmediatamente la acción enzimática, se pulveriza el tejido y se inactivan los enzimas mediante precipitación con ácido perclórico. El precipitado se elimina por centrifugación y se analizan los metabolitos en el sobrenadante clarificado. Para calcular la concentración intracelular, se determina el volumen intracelular a partir del contenido total de agua del tejido y de una determinación del volumen extracelular.

Las concentraciones intracelulares de los sustratos y productos de la reacción de la fosfofructoquinasa-1 de tejido cardíaco de rata aislado son las que figuran en la tabla siguiente.

etabolito	Concentración (μM)[a]
Fructosa 6-fosfato	87,0
Fructosa 1,6-bisfosfato	22,0
ATP	11.400
ADP	1.320

Fuente: Williamson, J.R., *J.Biol.Chem.* 240:2308, 1965.
[a]Calculada como μmol/mL de agua intracelular.

(a) Calcule Q, [fructosa 1,6-bisfosfato][ADP]/[fructosa 6-fosfato][ATP], para la reacción de la PKF-1 en condiciones fisiológicas.

(b) Dado que la $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción de la PKF-1 es de -14,2 kJ/mol, calcúlese la constante de equilibrio para esta reacción.

(c) Compárense los valores de Q y K'eq. ¿Está la reacción fisiológica cerca o lejos del equilibrio? Explíquelo. ¿Qué es lo que sugiere este experimento acerca del papel de la PKF-1 como enzima regulador?

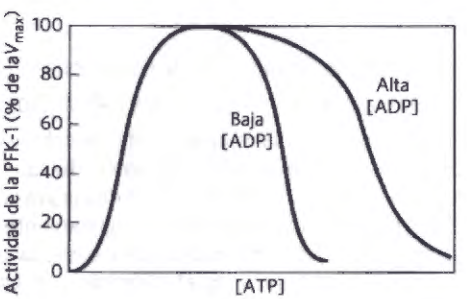
2. ¿Están todas las reacciones metabólicas en equilibrio?

(a) El fosfoenolpiruvato (PEP) es uno de los dos dadores de grupos fosforilo en la síntesis de ATP durante la glucólisis. En los eritrocitos humanos, la concentración del ATP en estado estacionario es 2,24 mM, siendo la del ADP de 0,25 mM y la del piruvato de 0,051 mM. Calcule la concentración de PEP a 25 °C suponiendo que la reacción de la piruvato quinasa (véase la Fig. 13-13) está en equilibrio en la célula.

(b) La concentración fisiológica de PEP en los eritrocitos humanos es de 0,023 mM. Compárese ésta con el valor obtenido en (a). Explique el significado de esta diferencia.

3. Efecto del suministro de O2 sobre las tasas glucolíticas Los pasos regulados de la glucólisis en células intactas pueden identificarse mediante el estudio del catabolismo de la glucosa en tejidos completos u órganos. Por ejemplo, el consumo de glucosa por el músculo cardiaco puede medirse mediante circulación sanguínea artificial a través de un corazón aislado e intacto. Para ello se mide la glucosa en sangre antes y después de su paso por el corazón. Si la sangre circulante está desoxigenada, el músculo cardiaco consumirá glucosa a una velocidad constante. Cuando se añade oxígeno a la sangre, se produce una importante caída del consumo de glucosa y se mantiene a esa nueva velocidad reducida. ¿Por qué?

4. Regulación de la PFK-1 A continuación se muestra el efecto del ATP sobre el enzima alostérico PKF-1. Para una concentración determinada de fructosa 6-fosfato, la actividad de la PKF-1 aumenta a medida que aumenta la concentración de ATP, pero se alcanza un punto más allá del cual el aumento de la concentración de ATP inhibe el enzima.



(a) Explique cómo puede el ATP jugar el doble papel de sustrato e inhibidor de la PFK-1. ¿Cómo se regula el enzima por el ATP?

(b) ¿Cómo se regula la glucólisis por la concentración de ATP?

(c) Explique por qué la inhibición de la PFK-1 por el ATP disminuye cuando la concentración de ADP es alta tal como se muestra en el gráfico.

5. Concentración celular de glucosa La concentración de glucosa en el plasma sanguíneo humano se mantiene alrededor de 5 mM. La concentración de glucosa libre en el interior de un miocito es muy inferior. ¿Por qué es tan baja la concentración en la célula? ¿Qué le pasa a la glucosa después de entrar en la célula? La glucosa se administra intravenosamente como fuente de alimento en algunos casos clínicos. Dado que la transformación de glucosa en glucosa 6-fosfato consume ATP, ¿por qué no se administra glucosa 6-fosfato por vía intravenosa?

6. Actividad enzimática y función fisiológica La V_{max} de la glucógeno fosforilasa de músculo esquelético es mucho mayor que la V_{max} del mismo enzima de tejido hepático.

(a) ¿Cuál es la función fisiológica de la glucógeno fosforilasa en el músculo esquelético? ¿Y en el tejido hepático?

(b) ¿Por qué la *V*max del enzima muscular ha de ser mayor que la del enzima hepático?

7. Equilibrio de la glucógeno fosforilasa La glucógeno fosforilasa cataliza la eliminación de glucosa a partir del glucógeno. La $\Delta G'^{\circ}$ para esta reacción es 3,1 kJ/mol.

(a) Calcule la proporción de [Pi] a [glucosa 1-fosfato] cuando la reacción se halla en el equilibrio. (Pista: la eliminación de unidades de glucosa a partir del glucógeno no cambia la concentración de este último).

(b) La proporción de [Pi] a [glucosa 1-fosfato] determinada en miocitos en condiciones fisiológicas es superior a 100:1. ¿Qué nos indica esto respecto a la dirección del flujo de metabolitos a través de la reacción de la glucógeno fosforilasa en el músculo?

(c) ¿Por qué son tan diferentes las proporciones de equilibrio y las fisiológicas? ¿Cual es el posible significado de esta diferencia?

8. Regulación de la glucógeno fosforilasa En el tejido muscular, la velocidad de conversión de glucógeno en glucosa 6-fosfato viene determinada por el cociente entre fosforilasa *a* (activa) y fosforilasa *b* (menos activa). ¿Qué le ocurre a la velocidad de degradación del glucógeno si una preparación de músculo que contiene glucógeno fosforilasa se trata con (a) fosforilasa quinasa y ATP; (b) PP1; (c) adrenalina?

9. Degradación del glucógeno en el músculo de conejo La utilización intracelular de la glucosa y del glucógeno está fuertemente regulada en cuatro puntos. Con el fin de comparar la regulación de la glucólisis cuando hay abundancia de oxígeno y cuando está ausente, considere la utilización de la glucosa y del glucógeno por el músculo de la pata de conejo en dos situaciones fisiológicas: un conejo en reposo, con baja demanda de ATP, y un conejo que avista su enemigo mortal, el coyote, y que corre hacia su madriguera. Para cada situación determine las concentraciones relativas (alta, intermedia o baja) de AMP, ATP, citrato y acetil-CoA y describa de qué modo afectan estas concentraciones al flujo de metabolitos a través de la glucólisis al regular enzimas específicos. En períodos de estrés, el músculo de la pata del conejo produce gran parte de su ATP mediante glucólisis anaeróbica (fermentación a lactato) y muy poca por oxidación del acetil-CoA obtenido por degradación de grasas.

10. Degradación del glucógeno en las aves migratorias A diferencia del conejo con sus carreras cortas, las aves migratorias requieren energía durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, los patos vuelan generalmente varios miles de quilómetros durante su migración anual. Los músculos de vuelo de las aves migratorias tienen una gran capacidad oxidativa y obtienen el ATP necesario mediante la oxidación del acetil-CoA (obtenido de las grasas) vía ciclo del ácido cítrico. Compare la regulación de la glucólisis muscular durante la actividad intensa pero corta, como en el caso del conejo que huye, con la que tiene lugar durante una actividad prolongada, como sucede con las aves migratorias. ¿Por qué ha de ser diferente la regulación en estas dos situaciones?

11. Defectos enzimáticos en el metabolismo glucídico A continuación se presentan los resúmenes de cuatro casos clínicos. Para cada caso determine cuál es el enzima defectuoso y elija el tratamiento adecuado a partir de la lista al final del problema. Justifique sus elecciones. Conteste las preguntas formuladas en cada caso. (Puede que necesite referirse a la información contenida en el Capítulo 14).

Caso A El paciente presenta vómitos y diarrea poco después de la ingestión de leche. Se le hace una prueba de tolerancia a la lactosa. (El paciente ingiere una cantidad estándar de lactosa midiéndose a intervalos la concentración de glucosa y galactosa en el plasma sanguíneo. En los individuos con un metabolismo glucídico normal los valores aumentan hasta un máximo en aproximadamente 1 h para disminuir seguidamente). La concentración sanguínea de glucosa y de galactosa en el paciente no aumenta durante la prueba. ¿Por qué la glucosa y galactosa sanguíneas aumentan y luego disminuyen durante la prueba en los individuos normales? ¿Por qué no aumentan en el caso del paciente?

Caso B El paciente presenta vómitos y diarrea después de la ingestión de leche. Se encuentra que su sangre tiene una concentración baja de glucosa pero una concentración muy superior a la normal de azúcares reductores. La orina da una prueba positiva para la galactosa. ¿Por qué es alta la concentración de azúcares reductores en la sangre? ¿Por qué aparece la galactosa en la orina?

Caso C El paciente se queja de rampas musculares dolorosas cuando realiza ejercicio físico vigoroso pero no presenta más síntomas. Una biopsia muscular indica una concentración de glucógeno muscular muy superior a la normal. ¿Por qué se acumula el glucógeno?

Caso D La paciente es letárgica, su hígado está hipertrofiado y una biopsia del mismo muestra grandes cantidades de glucógeno. También tiene un nivel de glucosa sanguínea inferior al normal. Explique el motivo de la baja concentración de glucosa sanguínea en esta paciente.

Enzima defectuoso

(a) PFK-1 muscular
(b) Fosfomanosa isomerasa
(c) Galactosa 1-fosfato uridililtransferasa
(d) Glucógeno fosforilasa hepática
(e) Triosa quinasa
(f) Lactasa de la mucosa intestinal
(g) Maltasa de la mucosa intestinal
(h) Enzima desramificante muscular

Copystation

Tratamiento

1. Jogging de 5 km cada día
2. Dieta sin grasas
3. Dieta baja en lactosa
4. Evitar el ejercicio vigoroso
5. Grandes dosis de niacina (ácido nicotínico, precursor del NAD+)
6. Comidas frecuentes (pequeñas porciones) de una dieta normal.

12. Efectos de la insuficiencia de insulina en una persona con diabetes Un hombre con diabetes insulino-dependiente llega a urgencias en estado casi comatoso. Mientras pasaba las vacaciones en un lugar solitario perdió su medicación de insulina y no había recibido insulina durante dos días.

(a) Para cada uno de los tejidos señalados a continuación, ¿es cada ruta más rápida, más lenta o no varía en este paciente, en comparación con el nivel normal cuando recibe las cantidades adecuadas de insulina?

(b) Describa para cada ruta al menos un mecanismo de control responsable del cambio que haya predicho.

Tejidos y rutas

1. Adiposo: síntesis de ácidos grasos
2. Músculo: glucólisis, síntesis de ácidos grasos; síntesis de glucógeno
3. Hígado: glucólisis, gluconeogénesis; síntesis de glucógeno; síntesis de ácidos grasos; ruta de las pentosas fosfato

13. Metabolitos de la sangre en la insuficiencia de insulina Para el paciente descrito en el Problema 12, prediga los niveles en sangre de los siguientes metabolitos *antes* del tratamiento en urgencias, en relación con las concentraciones mantenidas durante el tratamiento adecuado con insulina: (a) glucosa; (b) cuerpos cetónicos; (c) ácidos grasos libres.

14. Efectos metabólicos de enzimas mutantes Prediga y explique el efecto sobre el metabolismo del glucógeno de cada uno de los siguientes defectos debidos a mutaciones: (a) pérdida del sitio de unión de cAMP en la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA); (b) pérdida del inhibidor de la proteína fosfatasa (inhibidor 1 de la Fig. 15-42); (c) sobreexpresión de fosforilasa *b* quinasa en el hígado; (d) receptores de glucagón defectuosos en el hígado.

15. Control hormonal del combustible metabólico Entre la cena y el desayuno su glucosa sanguínea desciende y su hígado se transforma en un productor neto y no un consumidor de glucosa. Describa la base hormonal de este cambio y explique de qué modo el cambio hormonal desencadena la producción de glucosa por el hígado.

16. Metabolismo alterado en ratones manipulados genéticamente Se pueden manipular los genes de un ratón de modo que un único gen en un solo tejido puede producir una proteína inactiva (un ratón "genosuprimido") o una proteína que es siempre (constitutivamente) activa. ¿Qué efectos puede predecir sobre el metabolismo con los siguientes cambios genéticos: (a) genosupresión del enzima desramificador del glucógeno en el hígado; (b) genosupresión de la hexoquinasa IV del hígado; (c) genosupresión de la FBPasa-2 del hígado; (d) de la FBPasa-2 constitutivamente activa en el hígado; (e) constitutivamente activo de la AMPK del músculo; (f) ChREBP constitutivamente activa en el hígado?

Problema de análisis de datos

17, Estructura óptima del glucógeno Las células musculares necesitan un acceso rápido a grandes cantidades de glucosa durante el ejercicio intenso. Esta glucosa se almacena en el hígado y en el músculo esquelético en forma polimérica como partículas de glucógeno. Una partícula de glucógeno típica contiene unos 55.000 residuos de glucosa (véase la Fig. 15-35b). Meléndez-Hevia, Wadell y Shelton (1993) exploraron algunos aspectos teóricos de la estructura del glucógeno, tal como se describen en este problema.

(a) La concentración celular de glucógeno en el hígado es aproximadamente 0,01 μM. ¿Qué concentración de glucosa libre sería necesaria para almacenar una cantidad equivalente de glucosa? ¿Por qué esta concentración de glucosa libre sería problemática para la célula?

La glucosa se libera a partir del glucógeno gracias a la glucógeno fosforilasa, un enzima que puede eliminar moléculas de glucosa, una en cada paso, desde un extremo de una cadena de glucógeno. Las cadenas de glucógeno están ramificadas (véanse las Figs. 15-28 y 15-35b) y en ellas el grado de ramificación, el número de ramas por cadena, tiene una poderosa influencia sobre la velocidad a la que la glucógeno fosforilasa puede liberar glucosa.

(b) ¿Por qué un grado de ramificación demasiado bajo (es decir por debajo del nivel óptimo) reduciría la velocidad de liberación de glucosa? (Pista: Considere el caso extremo de que no hubiesen ramificaciones en una cadena de 55.000 residuos de glucosa).

(c) ¿Por qué un grado de ramificación que fuese demasiado elevado reduciría la velocidad de liberación de glucosa? (Pista: Piense en los impedimentos físicos).

Meléndez-Hevia y colaboradores realizaron diversos cálculos y encontraron que dos ramas por cadena (véase la Fig. 15-35b) sería óptimo para los impedimentos físicos descritos anteriormente. Esto es lo que se encuentra en el glucógeno almacenado en músculo e hígado.

Para determinar el número óptimo de residuos de glucosa por cadena, Meléndez-Hevia y coautores consideraron dos parámetros clave que definen la estructura de una partícula de glucógeno: t = número de niveles de cadenas de glucosa en una partícula (la molécula de la Fig. 15-35b tiene cinco niveles); g_c = número de residuos de glucosa por cadena. Se propusieron encontrar los valores de t y g_c que maximizarían tres cantidades: (1) la cantidad de glucosa almacenada en la partícula (G_T) por unidad de volumen; (2) el número de cadenas de glucosa no ramificadas (C_A) por unidad de volumen (es decir, el número de cadenas en el nivel más exterior, fácilmente accesibles a la glucógeno fosforilasa) y (3) la cantidad de glucosa disponible para la fosforilasa en estas cadenas sin ramificar (G_{PT}).

(d) Demuestre que $C_A = 2^{t-1}$. Éste es el número de cadenas asequibles a la glucógeno fosforilasa antes de la acción del enzima desramificante.

(e) Demuestre que C_T, el número total de cadenas en la partícula, viene dado por $C_T = 2^t\text{-}1$. Así $G_T = g_c(C_T) = g_c(2^t\text{-}1)$, número total de residuos de glucosa en la partícula.

(f) La glucógeno fosforilasa no puede eliminar glucosa de las cadenas de glucógeno que tienen menos de cinco residuos. Demuestre que $G_{PT} = (g_c - 4)(2^{t-1})$. Ésta es la cantidad de glucosa fácilmente asequible a la glucógeno fosforilasa.

(g) En función del tamaño del residuo de glucosa y la localización de las ramificaciones, el grosor de un nivel de glucó-

COPY STATION

geno es $0{,}12g_c$ nm + 0,35 nm. Demuestre que el volumen de una partícula, V_s, viene dado por la ecuación

$V_s = {}^4/_3\pi t^3(0.12g_c + 0.35)^3$ nm^3.

Meléndez-Hevia y coautores determinaron seguidamente los valores óptimos de t y g_c, los que daban lugar a un valor máximo de una función de calidad, f, que maximiza G_T, C_A y G_{PT}, mientras que se minimiza V_s: $f = \frac{G_T C_A G_{PT}}{V_S}$. Encontraron que el valor óptimo de g_c es independiente de t.

(h) Escoja un valor de t entre 5 y 15 y encuentre el valor óptimo de g_c. ¿Qué relación tiene este valor con el de g_c encontrado con el glucógeno hepático (véase la Fig. 15-35b)? (Pista: Puede que le sea útil un programa "spreadsheet).

Referencia

Meléndez-Hevia, E., T.G. Waddell, and E.D. Shelton. 1993. Optimization of molecular design in the evolution
of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* 295:477–483

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 16

El ciclo del ácido cítrico

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado) 617

16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico 622

16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico 637

En el Capítulo 14 vimos que algunas células obtienen energía (ATP) a partir de la fermentación, degradando glucosa en ausencia de oxígeno. Para la mayor parte de células eucarióticas y un gran número de bacterias que viven en condiciones aeróbicas y oxidan sus combustibles orgánicos a dióxido de carbono y agua, la glucólisis no es sino la primera etapa de la oxidación completa de la glucosa. El piruvato formado en la glucólisis en vez de ser reducido a lactato, etanol o algún otro producto de fermentación, sufre una oxidación mayor hasta H_2O y CO_2. Esta fase aeróbica del catabolismo se denomina **respiración**. En el sentido fisiológico más amplio o macroscópico, la respiración se refiere a la captación de O_2 por un organismo multicelular y la consiguiente liberación de CO_2. Sin embargo, los bioquímicos y los biólogos celulares utilizan este término en un sentido más estricto para referirse a los procesos moleculares mediante los que *las células* consumen O_2 y producen CO_2, procesos conocidos más precisamente como **respiración celular**.

La respiración celular tiene lugar en tres fases principales **(Fig. 16-1)**. En la primera, las moléculas de combustible orgánico (glucosa, ácidos grasos y algunos aminoácidos) se oxidan para dar lugar a fragmentos de dos átomos de carbono en forma del grupo acetilo del acetil-coenzima A (acetil-CoA). En la segunda fase, los grupos acetilo se oxidan a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico y la mayor parte de la energía de estas oxidaciones se conserva en los transportadores de electrones reducidos NADH y $FADH_2$. En la tercera fase de la respiración, estos coenzimas reducidos son a su vez oxidados, liberando protones (H^+) y electrones. Los electrones son transferidos al O_2, el aceptor electrónico final, a lo largo de una cadena de moléculas transportadoras, conocida como cadena respiratoria, que da lugar a la formación de agua (H_2O). Durante este proceso de transferencia electrónica una gran parte de la energía disponible a partir de las reacciones redox se conserva en forma de ATP gracias a un proceso conocido como fosforilación oxidativa (Capítulo 19). La respiración es más compleja que la glucólisis y se cree que apareció mucho más tarde, después del aumento en los niveles de oxígeno atmosféricos como resultado de la evolución de la fotosíntesis debida a las cianobacterias. Tal como se discutió en el Capítulo 1 el aumento de los niveles de oxígeno fue un punto de inflexión determinante en el proceso de la evolución.

Consideraremos en primer lugar la conversión del piruvato en grupos acetilo seguido por la entrada de estos grupos en el **ciclo del ácido cítrico**, llamado también **ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA)** o **ciclo de Krebs** (por su descubridor, Hans Krebs). Repasaremos a continuación las reacciones del ciclo y los enzimas que las catalizan. Dado que intermediarios del ciclo del ácido cítrico son extraidos del ciclo para ser utilizados como precursores biosintéticos consideraremos algunas vias en las cuales se reponen estos intermediarios. El ciclo del acido cítrico es un punto clave del metabolismo, con rutas degradativas que conducen al mismo y rutas anabólicas que salen de él, al tiempo que está finamente regulado en coordinación con otras rutas.



Hans Krebs, 1900–1981 [Fuente: Keystone Pictures USA/Alamy.]

16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado)

En los organismos aeróbicos, la glucosa y otros azúcares, los ácidos grasos y la mayor parte de los aminoácidos se oxidan finalmente a CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria. Antes de entrar en el ciclo del ácido cítrico, los esqueletos carbonados de azúcares y ácidos grasos deben ser degradados al grupo acetilo del acetil-CoA, la forma en que el ciclo del ácido cítrico acepta la mayor parte del com-

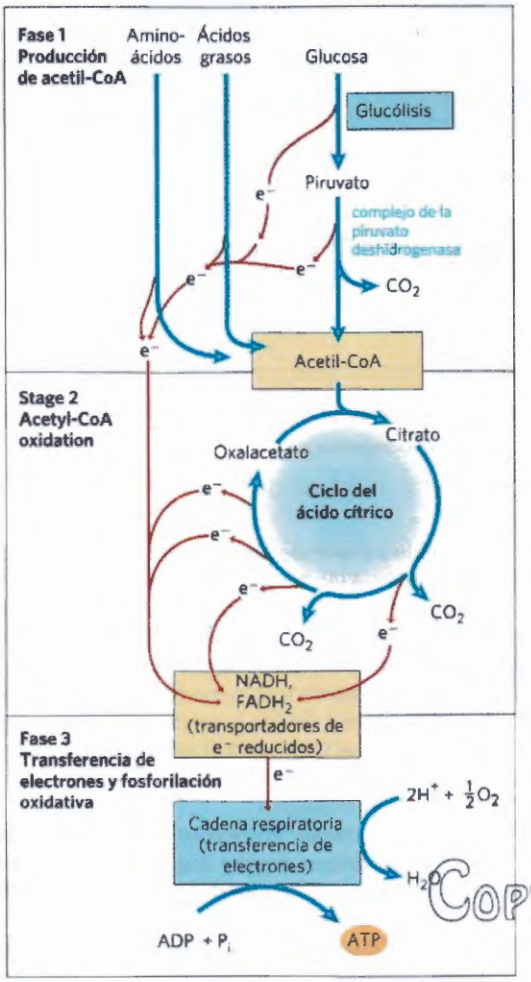


FIGURA 16-1 Catabolismo de proteínas, grasas y glúcidos en las tres etapas de la respiración celular. Etapa 1: oxidación de los ácidos grasos, glucosa y algunos aminoácidos que dan acetil-CoA. Etapa 2: la oxidación de los grupos acetilo en el ciclo del ácido cítrico incluye cuatro pasos en los que se sustraen electrones. Etapa 3: los electrones transportados por el NADH y el $FADH_2$ llegan a una cadena de transportadores electrónicos mitocondriales (o bien transportadores unidos a la membrana plasmática, en el caso de las bacterias) -la cadena respiratoria- con reducción final del O_2 a H_2O. Este flujo electrónico impulsa la producción de ATP.

bustible aportado. Muchos de los carbonos de los aminoácidos también entran en el ciclo en forma de acetato, aunque las vías de degradación de algunos aminoácidos dan lugar a otros intermediarios del ciclo tales como el succinato y el malato, que, a continuación, entran en el ciclo.

El piruvato generado por glucólisis en el citosol representa un nódulo en el metabolismo de glúcidos, grasas y proteínas. El piruvato que entra en la mitocondria puede ser oxidado por el ciclo del ácido cítrico para generar energía o, después de su conversión en acetil-CoA, puede utilizarse como material de partida para la síntesis de ácidos grasos y esteroles. Un tercer destino posible del piruvato es como precursor de la síntesis de aminoácidos (Capítulo 22). En la **glucólisis aeróbica**, el piruvato no experimenta ninguna oxidación posterior a través del ciclo del ácido cítrico, aun cuando haya oxígeno disponible para hacerlo; en vez de ello, el piruvato simplemente se reduce a lactato en el citosol, regenerando NAD^+ para la producción continuada de ATP por la glucólisis.

Hemos visto que en muchos tipos de cáncer, la glucosa experimenta glucólisis aeróbica en el citosol, con lactato como producto secundario (el efecto Warburg; véase Recuadro 14-1). Debido a que la entrada del piruvato en la mitocondria (y su posterior oxidación) es más lenta en los tumores, es de gran interés el mecanismo por el que el piruvato entra en la mitocondria. Para entrar en la matriz, el piruvato difunde primero a través de amplias oberturas de la membrana mitocondrial externa y, a continuación, es transportado a través de la membrana mitocondrial interna por el **transportador mitocondrial de piruvato (MPC)**, un transportador pasivo específico para el piruvato. El MPC está codificado por dos genes *MPC1* y *MPC2*, que están mutados en una proporción elevada (80%) en ciertos cánceres entre los que se incluyen gliomas (tumores de las células gliales del cerebro). Estas mutaciones reducen la fracción de piruvato citosólico que se oxida mediante el ciclo del ácido cítrico, reducción que podría explicar, en principio, el efecto Warburg. ■

En células normales (no tumores), el piruvato de la matriz mitocondrial se oxida a acetil-CoA y CO_2 por el **complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH)**. Este agrupamiento altamente ordenadode enzimas, con múltiples copias de cada uno de los tres enzimas, está localizado en las mitocondrias de las células eucarióticas ny en el citosol de las bacterias.

El estudio a fondo de este complejo enzimático puede resultar interesante por diversas razones. El complejo de la PDH es un ejemplo clásico y bien estudiado de complejo multienzimático en el que una serie de intermedios químicos permanecen unidos a las moléculas enzimáticas mientras se produce la transformación del sustrato en el producto final. En el mecanismo de reacción participan cinco cofactores, cuatro de ellos derivados de vitaminas. La regulación de este complejo enzimático ilustra también de qué manera una combinación de modificaciones covalentes y regulación alostérica permite obtener un control preciso del flujo a través de un paso metabólico. Finalmente, el complejo de la PDH es el prototipo de otros dos importantes complejos enzimáticos: la α-cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico y la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa de las rutas oxidativas de diversos aminoácidos (véase la Fig. 18-28). La extraordinaria similitud en su estructura proteica, los cofactores empleados y los mecanismos de reacción de estos tres complejos son, sin duda, reflejo de un origen evolutivo común; son parálogos.

Copy-Station

El piruvato se oxida a acetil-CoA y CO_2

La reacción global catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa es una **descarboxilación oxidativa**, un proceso de oxidación irreversible en el que el piruvato pierde un grupo carboxilo en forma de molécula de CO_2, mientras que los dos cabonos restantes se transforman en el grupo acetilo del acetil-CoA **(Fig. 16-2)**. El NADH formado en esta reacción libera un ión hidruro ($:H^-$) a la cadena respiratoria (Fig. 16-1), que transporta los dos electrones hasta el oxígeno o, en los microorganismos anaeróbicos, hasta un aceptor de

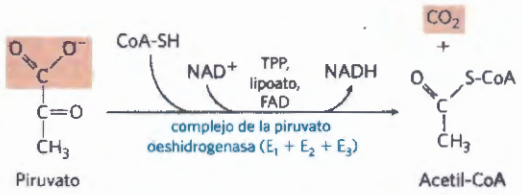


FIGURA 16-2 Reacción global catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Los cinco coenzimas que participan en esta reacción, así como los tres enzimas que forman el complejo enzimático, se discuten en el texto.

electrones alternativo tal como el nitrato o el sulfato. La transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno genera en última instancia 2,5 moléculas de ATP por cada par de electrones. Se ha demostrado la irreversibilidad de la reacción del complejo de la PDH mediante experimentos con isótopos radiactivos: el complejo no puede unir de nuevo CO_2 marcado radiactivamente al acetil-CoA para generar piruvato marcado en el grupo carboxilo.

El complejo de la piruvato deshidrogenasa necesita cinco coenzimas

La deshidrogenación y descarboxilación combinadas del piruvato para formar el grupo acetilo del acetil-CoA (Fig. 16-2) requiere la acción secuencial de tres enzimas diferentes, así como de cinco coenzimas o grupos prostéticos diferentes: tiamina pirofosfato (TPP), flavina adenina dinucleótido (FAD), coenzima A (CoA, a veces mostrado como CoA-SH para poner de relieve el papel del grupo -SH), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y lipoato. Cuatro vitaminas diferentes, esenciales en la nutrición humana, son componentes vitales de este sistema: la tiamina (en el TPP), la riboflavina (en el FAD), la nicotinamida (en el NAD) y el pantotenato (en el CoA). Ya hemos descrito los papeles del FAD y el NAD como transportadores de electrones (Capítulo 13), y hemos encontrado el TPP como coenzima de la piruvato descarboxilasa (véase la Fig. 14-15).

El coenzima A **(Fig. 16-3)** contiene un grupo tiol reactivo (-SH), de importancia fundamental dentro de su papel como transportador de grupos acilo en diversas reacciones metabólicas. Los grupos acilo se unen covalentemente al grupo tiol, formando **tioésteres**. A consecuencia de su relativamente elevada energía libre estándar de hidrólisis (véanse las Figs. 13-16, 13-17), los tioésteres tienen un elevado potencial de transferencia de grupos acilo, es decir la donación de sus grupos acilo a una serie de moléculas aceptoras es una reacción favorable. De este modo, puede considerarse que el grupo acilo unido al coenzima A, está "activado" para la transferencia de grupo.

El quinto cofactor del complejo de la PDH, el **lipoato (Fig. 16-4)**, tiene dos grupos tiol que pueden experimentar una oxidación reversible hasta formar un enlace disulfuro (-S-S-), similar al que se produce entre dos residuos Cys en proteínas. Gracias a esta capacidad de experimentar reacciones de oxidación-reducción, el lipoato puede actuar a la vez como transportador de electrones (hidrógeno) y de acilos tal como veremos a continuación.

El complejo de la piruvato deshidrogenasa está formado por tres enzimas diferentes

El complejo de la PDH está formado por copias múltiples de los tres enzimas: **piruvato deshidrogenasa** (E_1), **dihidrolipoil transacetilasa** (E_2) y **dihidrolipoil deshidrogenasa** (E_3). El número de copias de cada enzima, y por tanto el tamaño del complejo, varía de un organismo a otro. El complejo de la PDH aislado a partir de mamíferos tiene un diámetro de aproximadamente 50 nm, más de cinco veces el tamaño de un ribosoma y suficientemente grande para visualizarse a través del microscopio electrónico **(Fig. 16-5a)**. En el enzima bovino hay 60 copias idénticas de E_2 que forman un dodecaedro pentagonal (el núcleo) con un diámetro de unos 25 nm (Fig. 16-15b). (El núcleo del enzima de *Escherichia coli*, contiene 24 copias de E_2). E_2 es el punto de conexión del grupo prostético lipoato, unido a través de un enlace amida al grupo ε-amino de un residuo Lys (Fig. 16-4). E_2 tiene tres dominios funcional-

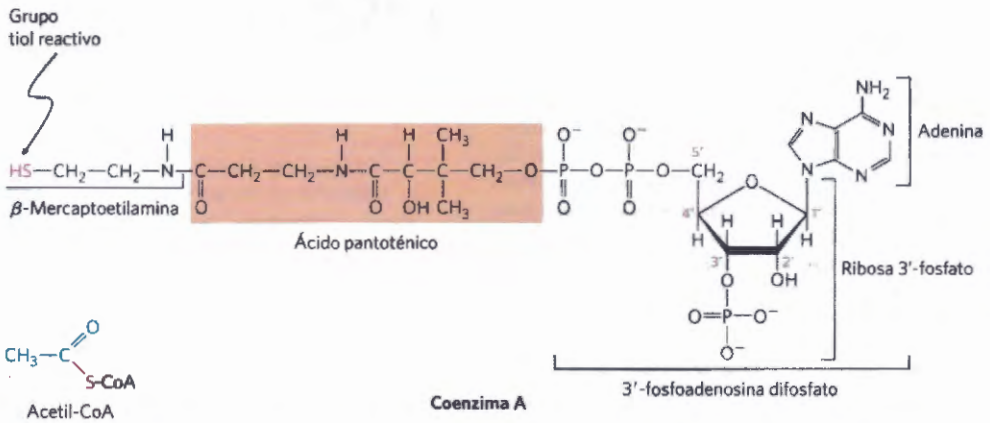


FIGURA 16-3 Coenzima A (CoA). Un grupo hidroxilo del ácido pantoténico se une a una porción de ADP modificado a través de un enlace éster fosfato, y su grupo carboxilo se une mediante un enlace amida a la β-mercaptoetilamina. El grupo hidroxilo en la posición 3' de la porción ADP tiene un grupo fosforilo que no está presente en el ADP libre. El grupo -SH de la porción mercaptoetilamina forma un tioéster con el acetato en el acetil-coenzima A (acetil-CoA) (parte inferior izquierda).

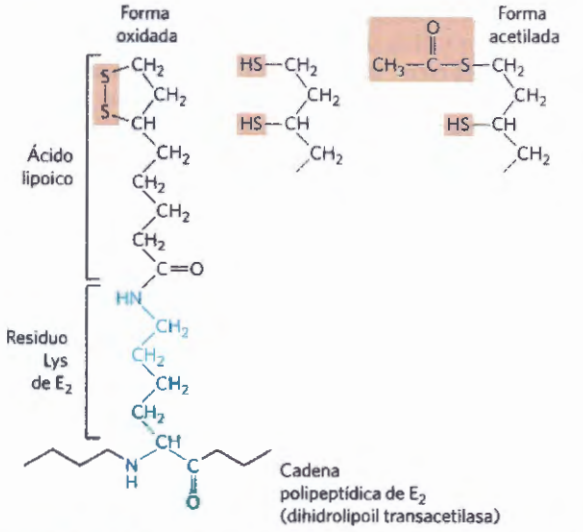


FIGURA 16-4 Ácido lipoico (lipoato) unido por enlace amida a un residuo Lys. La porción lipoil-lisilo es el grupo prostético de la dihidrolipoil transacetilasa (E_2 del complejo de la PDH). El grupo lipoilo puede hallarse oxidado (disulfuro) o bien reducido (ditiol) y actúa como un transportador de hidrógeno y de un grupo acetilo (u otro acilo).

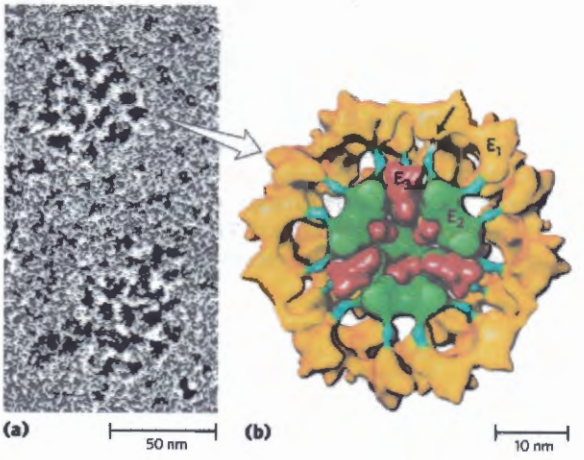
mente distintos (Fig. 16-5c): el *dominio lipoilo* amino terminal, que contiene el residuo(s) lipoil-Lys; el *dominio de unión* entre E_1 y E_3 central y el *dominio aciltransferasa* del núcleo interior, que contiene el sitio activo de la aciltransferasa. El complejo PDH de levadura tiene un único dominio lipoilo con un lipoato unido, pero el complejo de mamíferos tiene dos y el de *E. coli* tiene tres (Fig. 16-5c). Los dominios de E_2 están separados por conectores, secuencias de 20 a 30 residuos aminoácidos, ricas en Ala y Pro entremezcladas con residuos cargados; estos conectores tienden a adoptar sus formas extendidas con lo que mantienen separados los tres dominios.

El sitio activo de E_1 contiene TPP unido, y el de E_3 contiene FAD unido. Existen además dos proteínas reguladoras, una proteína quinasa y una fosfoproteína fosfatasa, que también forman parte del complejo y que se describen posteriormente. Esta estructura básica E_1-E_2-E_3 se ha conservado durante la evolución y se utiliza en diversa reacciones metabólicas similares, entre las que se incluyen la oxidación del α-cetoglutarato en el ciclo del ácido cítrico (descrita más adelante) y la oxidación de los α-cetoácidos procedentes de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina (véase la Fig. 18-28). Dentro de una especie dada, E_3 del complejo de la PDH es idéntico a E_3 de los otros dos complejos enzimáticos. La unión del lipoato al extremo de la cadena lateral de una Lys en E_2 da lugar a un brazo largo y flexible que puede desplazarse desde el sitio activo de E_1 a los sitios activos de E_2 y E_3, una distancia de unos 5 nm o más.

En la canalización de sustratos, los intermedios nunca abandonan la superficie enzimática

En la **Figura 16-6** se muestra esquemáticamente de qué modo el complejo de la piruvato deshidrogenasa lleva a cabo las cinco reacciones consecutivas en la descarboxilación y deshidrogenación del piruvato. El paso ❶ es, en esencia, idéntico a la reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa (véase la Fig. 14-15c); el C-1 del piruvato se elimina en forma de CO_2, y el C-2, que en el piruvato se encuentra en el estado de oxidación correspondiente a un aldehído, se une al TPP en forma

COPY-STATION



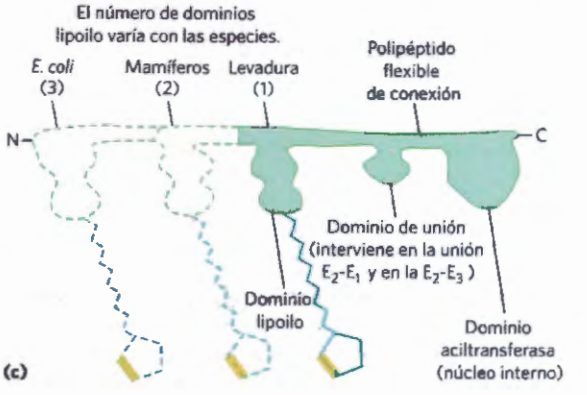


FIGURA 16-5 El complejo de la piruvato deshidrogenasa. (a) Micrografía crioelectrónica de complejos de la PDH aislados de riñón bovino. En la microscopia crioelectrónica se observan muestras biológicas a temperaturas extremadamente bajas; esto impide la aparición de artefactos potenciales introducidos por el proceso usual de deshidratación, fijación y tinción. (véase el Recuadro 19-1) **(b)** Imagen tridimensional del complejo de la PDH que muestra la estructura de subunidades: E_1, piruvato deshidrogenasa; E_2, dihidrolipoil transacetilasa y E_3, dihidrolipoil deshidrogenasa. Esta imagen se ha reconstruido mediante análisis de un gran número de imágenes tales como las que aparecen en **(a)**, en combinación con estudios cristalográficos de las subunidades individuales. El núcleo (verde) consta de 60 moléculas de E_2, ordenadas en 20 trímeros que forman un dodecaedro pentagonal. El dominio lipoilo de E_2 (azul) se proyecta hacia fuera para tocar los sitios activos de las moléculas de E_1 (amarillo) ordenadas sobre el núcleo de E_2. Varias subunidades de E_3 (rojo) también están unidas al núcleo en donde el brazo basculante presente en E_2 puede alcanzar sus sitios activos. El sitio en donde un grupo lipoilo está unido al dominio lipoilo de E_2 está marcado con un asterisco. Para que la estructura sea más clara se han eliminado alrededor de la mitad del complejo perteneciente a la parte frontal. **(c)** E_2 consta de tres tipos de dominios unidos por polipéptidos cortos de conexión: un dominio catalítico aciltransferasa, un dominio de unión, que interviene en la unión de E_2 a E_1 y E_3 y uno o más dominios lipoilo (según la especie). [Fuente: **(a)** Cortesía del Dr. Richard H. Trelease. **(b)** Cortesía del Dr. A Hong-Zhou, Director, Electron Imaging Center for NanoMachines (EICN).]

de grupo hidroxietilo. Este primer paso es el más lento y, por tanto, limita la velocidad de la reacción global. Es también el punto en el que el complejo de la PDH ejerce su especificidad de sustrato. En el pasob ❷, el grupo hidroxietilo se oxida para dar lugar a un ácido carboxílico (acetato). Los dos electrones eliminados en esta reacción de oxidación reducen el –S–S– de un grupo lipoilo en E_2 para dar lugar a dos grupos tiol (–SH). La porción acetilo producida en esta reacción de oxidación-reducción se esterifica en primer lugar con uno de los grupos –SH del lipoilo, y a continuación se transesterifica con el CoA para dar lugar a acetil-CoA (paso ❸). Así, la energía de oxidación impulsa la formación de un tioéster del acetato de elevada energía. El resto de las reacciones catalizadas por el complejo de la PDH (por E_3 en los pasos ❹ y ❺) son transferencias electrónicas necesarias para la regeneración de la forma oxidada (disulfuro) del grupo lipoilo de E_2, preparando así el complejo enzimático para otro ciclo oxidativo. Los electrones extraídos del grupo hidroxietilo procedente del piruvato pasan a través del FAD al NAD^+.

Los brazos basculantes lipoil-lisilo de E_2 desempeñan un papel central en el mecanismo del complejo de la PDH al aceptar de E_1 los dos electrones y el grupo acetilo procedentes del piruvato y pasarlos a E_3. Todos estos enzimas y coenzimas se encuentran agrupados, lo que permite que los intermedios reaccionen rápidamente sin difundir fuera de la superficie del complejo enzimático. La secuencia de cinco reacciones mostrada en la Figura 16-6 es, por tanto, un ejemplo de **canalización de sustratos**. Los intermedios de la secuencia de varios pasos nunca abandonan el complejo con lo que la concentración local del sustrato de E_2 se mantiene siempre muy alta. La canalización también impide el robo del grupo acetilo activado por otros enzimas que utilizan este grupo como sustrato. Tal como veremos, un mecanismo de ligado similar para la canalización del sutrato entre sitios activos es utilizado en diversos enzimas en los que el lipoato, la biotina o una porción tipo CoA actúan como cofactores.

Como es de esperar, tanto las mutaciones en los genes de las subunidades del complejo de la PDH como la deficiencia de tiamina en la dieta pueden acarrear graves consecuencias. Los animales que presentan deficiencia de tiamina no son capaces de oxidar el piruvato con normalidad. Esto es especialmente importante para el cerebro que obtiene normalmente toda su energía de la oxidación aeróbica de la glucosa, a través de una ruta que necesariamente incluye la oxidación del piruvato. El beriberi, una enfermedad causada por una carencia de tiamina, se caracteriza por la pérdida de función neuronal. Esta enfermedad incide principalmente en poblaciones cuya alimentación depende básicamente del arroz blanco (pulido) que carece de las cáscaras en las que se encuentra la mayor parte de la tiamina del arroz. Las personas que consumen habitualmente grandes cantidades de alcohol también pueden desarrollar una deficiencia de tiamina; la mayor parte de su dieta diaria, bebidas alcohólicas destiladas, son "calorías vacías" exentas de vitaminas. Un nivel elevado de piruvato en sangre suele indicar defectos en la oxidación del píruvato producidos por una de estas causas. ■

RESUMEN 16.1 Producción de acetil-CoA (acetato activado)

- El piruvato, producto de la glucólisis, es tramsportado a la matriz mitocondrial por el transportador mitocondrial de piruvato.
- El piruvato se convierte en acetil-CoA, material de partida del ciclo del ácido cítrico, por acción del complejo de la piruvato deshidrogenasa.
- El complejo de la PDH está compuesto por múltiples copias de tres enzimas: piruvato deshidrogenasa, E_1 (con su cofactor ligado el TPP); dihidrolipoil transa-

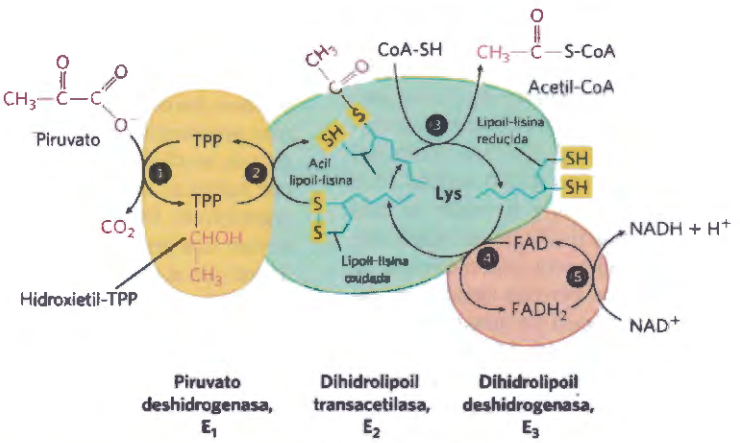


FIGURA 16-6 Descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA por el complejo de la PDH. El destino del piruvato se muestra en rojo. En el paso ❶, el piruvato reacciona con la tiamina pirofosfato (TPP) unida a la piruvato deshidrogenasa (E_1), experimentando una descarboxilación hasta el derivado hidroxietilo (véase Fig. 14-15). La piruvato deshidrogenasa es también la responsable del paso ❷. En él se transfieren dos electrones y el grupo acetilo desde la TPP hasta la forma oxidada del grupo lipoil-lisilo del enzima núcleo, la dihidrolipoil transacetilasa (E_2), formándose el acetil tioéster del grupo lipoilo reducido. El paso ❸ es una transesterificación en la que el grupo -SH del CoA sustituye el grupo -SH de E_2 para obtener acetil-CoA y el grupo lipoilo en su forma completamente reducida (ditiol). En el paso ❹, la dihidrolipoil deshidrogenasa (E_3) promueve la transferencia de dos átomos de hidrógeno de los grupos lipoilo reducidos de E_2 al grupo prostético FAD de E_3, restableciendo la forma oxidada del grupo lipoil-lisilo de E_2. En el paso ❺, el $FADH_2$ reducido de E_3 transfiere un ión hidruro al NAD^+, formando NADH. El complejo enzimático está ya preparado para un nuevo ciclo catalítico. (Los colores de las subunidades se corresponden con los de la Fig. 16-5b).

cetilasa, E_2 (con su grupo lipoilo unido de modo covalente) y dihidrolipoil deshidrogenasa, E_3 (con sus cofactores FAD y NAD).

- E_1 cataliza en primer lugar la descarboxilación del piruvato, produciendo hidroxietil-TPP y a continuación la oxidación del grupo hidroxietilo a grupo acetilo. Los electrones de esta oxidación reducen el disulfuro del lipoato unido a E_2 y se transfiere el grupo acetilo en forma de enlace tioéster con un grupo –SH del lipoato reducido.
- E_2 cataliza la transferencia del grupo acetilo al coenzima A formando acetil-CoA.
- E_3 cataliza la regeneración de la forma disulfuro (oxidada) del lipoato; los electrones pasan primero al FAD y, a continuación, al NAD^+.
- El largo brazo de lipoil-lisina bascula desde el sitio activo de E_1 al de E_2 y al de E_3, ligando los intermedios al complejo enzimático para permitir la canalización de los sustratos.
- La organización del complejo de la PDH es muy similar a la de los complejos enzimáticos que catalizan la oxidación del α-cetoglutarato y la de los α-cetoácidos de cadena ramificada.

16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico

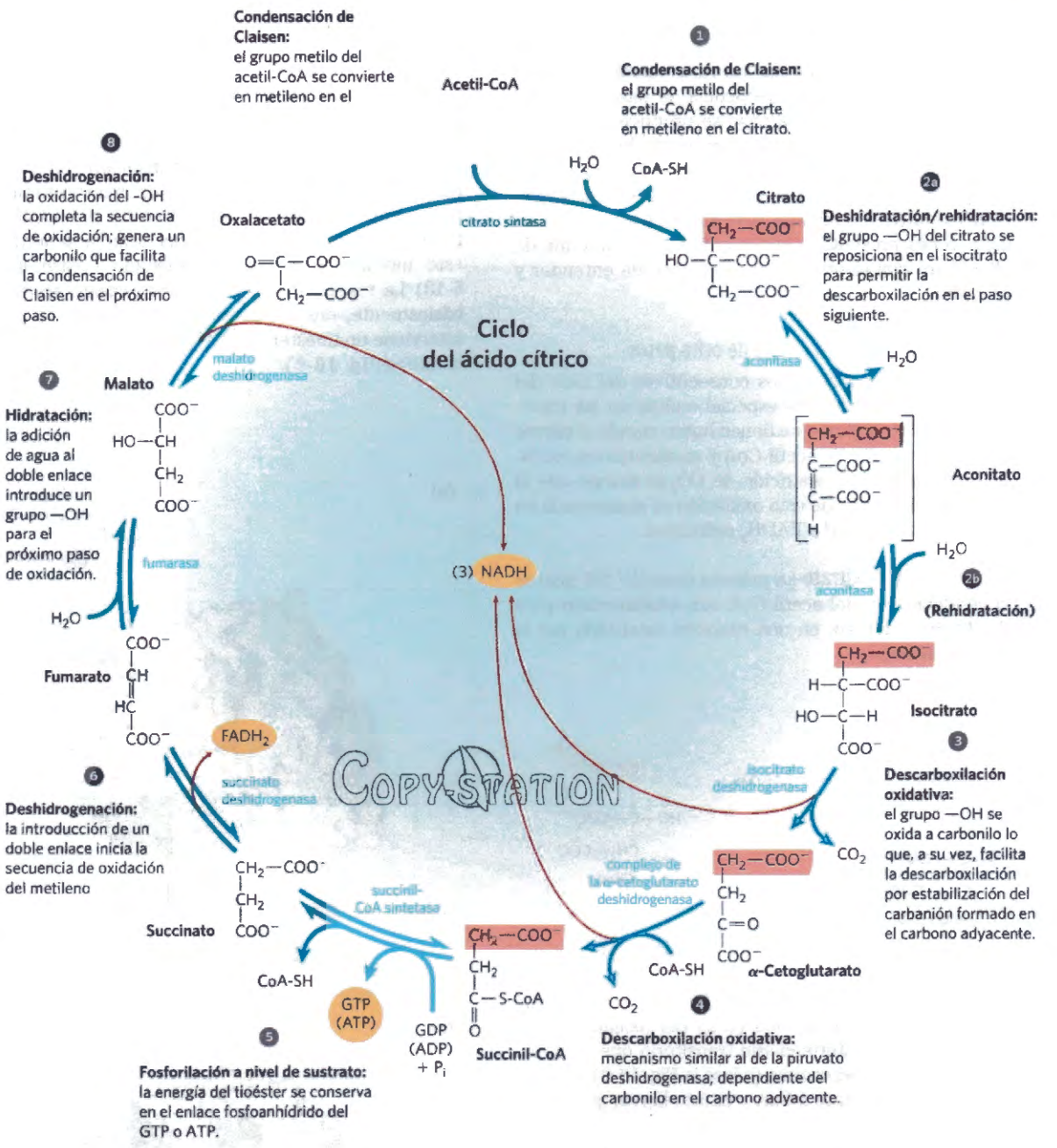
Podemos ahora seguir el proceso mediante el cual se oxida el acetil-CoA. Dicha transformación química se realiza en el ciclo del ácido cítrico, la primera vía metabólica *cíclica* que hemos encontrado **(Fig. 16-7)**. Para iniciar una vuelta del ciclo el acetil-CoA cede su grupo acetilo al oxalacetato, un compuesto de cuatro átomos de carbono, formando una molécula de citrato de seis carbonos. El citrato se transforma entonces en isocitrato, otra molécula de seis carbonos, que al deshidrogenarse perdiendo CO_2 genera α-cetoglutarato, un compuesto de cinco átomos de carbono también llamado oxoglutarato. El α-cetoglutarato experimenta la pérdida de una segunda molécula de CO_2, produciendo finalmente succinato, un compuesto de cuatro carbonos. El succinato se convierte, mediante una secuencia de tres reacciones enzimáticas, en el compuesto de cuatro carbonos oxalacetato con lo que queda listo para reaccionar con otra molécula de acetil-CoA. En cada vuelta del ciclo se produce la entrada de un grupo acetilo (dos carbonos) en forma de acetil-CoA y la salida de dos moléculas de CO_2; se utiliza una molécula de oxalacetato para formar citrato y se regenera una molécula de oxalacetato. No se produce una pérdida neta de oxalacetato; en teoría, una sola molécula de este compuesto sería suficiente para promover la oxidación de un número infinito de grupos acetilo y, de hecho, el oxalacetato se encuentra en las células en concentraciones muy bajas. Cuatro de los ocho pasos de este proceso son oxidaciones en las que la energía de oxidación se conserva, con elevada eficiencia, en forma de los coenzimas reducidos NADH y $FADH_2$.

Tal como se dijo, a pesar del papel central que juega el ciclo del ácido cítrico en el metabolismo energético, su función no se limita a la conservación de la energía. Los intermediarios de cuatro y cinco átomos de carbono del ciclo actúan de precursores de una amplia gama de productos. Las células emplean las denominadas reacciones anapleróticas (de relleno), que describiremos más adelante, para reemplazar los intermediarios así desviados.

Eugene Kennedy y Albert Lehninger demostraron en 1948 que, en eucariotas, todas las reacciones del ciclo del ácido cítrico tienen lugar en la mitocondria. Observaron que las mitocondrias aisladas contienen no sólo todos los enzimas y coenzimas necesarios para el ciclo del ácido cítrico, sino también todos los enzimas y proteínas necesarios para que tenga lugar la última etapa de la respiración, es decir, la transferencia electrónica y la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa. Tal como veremos en capítulos posteriores, las mitocondrias también contienen los enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y de algunos aminoácidos a acetil-CoA y la degradación oxidativa de otros aminoácidos a α-cetoglutarato, succinil-CoA u oxalacetato. Así, en eucariotas no fotosintéticos, la mitocondria es el lugar donde se producen la mayor parte de reacciones oxidativas que liberan energía y la síntesis acoplada de ATP. En los eucariotas fotosintéticos la mayor parte del ATP producido en la oscuridad se genera en las mitocondrias, aunque los cloroplastos producen la mayor parte del ATP en condiciones de iluminación. En la mayoría de bacterias los enzimas del ciclo del ácido cítrico se localizan en el citosol, y su membrana plasmática tiene un papel análogo al desempeñado por la membrana mitocondrial interna en la síntesis de ATP (Capítulo 19).

La secuencia de reacciones en el ciclo del ácido cítrico son lógicas desde el punto de vista químico

El acetil-CoA producido en la degradación de glúcidos, grasas y proteínas ha de ser oxidado completamente a CO_2 si se quiere extraer el máximo de energía de estos combustibles. No obstante, la oxidación directa del acetato (o acetil-CoA) a CO_2 no es bioquímicamente factible. La descarboxilación de este ácido de dos carbonos produciría CO_2 y metano (CH_4). El metano es bastante estable químicamente y, con la excepción de ciertas bacterias metanotróficas que viven en nichos ricos en metano, los organismos no poseen los cofactores y enzimas necesarios para oxidar el metano. Sin embargo, los grupos metileno (—CH_2—), se metabolizan fácilmente por sistemas enzimáticos peresentes en la mayoría de organismos. En secuencias de oxidación típicas intervienen dos grupos metileno adyacentes (—CH_2-CH—), de los que al menos uno es adyacente a un grupo carbonilo. Tal como hemos observado en el Capítulo 13, los grupos carbonilo son muy importantes en las transformaciones químicas de las rutas metabólicas. El carbono del grupo carbonilo tiene una carga positiva parcial debido a la propiedad de extracción de electrones del oxígeno carbonílico por lo que es un centro electrofílico. Un grupo carbonilo puede facilitar la formación de un carbanión sobre un carbono vecino al deslocalizar la carga negativa del carbanión. En el ciclo del ácido cítrico observamos un ejemplo de oxidación de un grupo metileno cuando el succinato se oxida (pasos ❻ a ❽ en la Fig. 16-7), formando un carbonilo (en el oxalacetato) que es más reactivo químicamente que un grupo metileno o que el metano.



COPY-STATION

FIGURA 16-7 Reacciones del ciclo del ácido cítrico. Los átomos de carbono marcados en rosa son los correspondientes al acetato del acetil-CoA en la primera vuelta del ciclo. *No* son los carbonos liberados como CO_2 en la primera vuelta. Obsérvese que en el succinato y fumarato el grupo de dos átomos de carbono procedente del acetato ya no se puede distinguir específicamente; debido a que el succinato y el fumarato son moléculas simétricas, C-1 y C-2 son indistinguibles de C-4 y C-3. El número que aparece indicando cada paso corresponde al título referido en el texto (páginas 626-633). Las flechas rojas marcan los lugares donde se conserva la energía por transferencia electrónica a FAD o NAD^+, formando $FADH_2$ y NADH + H^+. Los pasos ❶, ❸ y ❹ son esencialmente irreversibles en la célula; todas los otros pasos son reversibles. El producto del paso ❺ puede ser ATP o GTP, en función del isozima de la succinil-CoA sintetasa que actúa como catalizador.

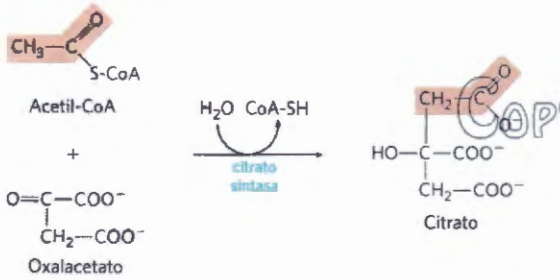
En resumen, si el acetil-CoA se ha de oxidar de manera eficiente el grupo metilo del acetil-CoA se ha de unir a algo. El primer paso del ciclo del ácido cítrico resuelve elegantemente este problema del grupo metilo no reactivo mediante la condensación del acetil-CoA con el oxalacetato. El carbonilo del oxalacetato actúa como centro electrofílico, que es atacado por el carbono del metilo del acetil-CoA en una condensación de Claisen que forma el citrato (paso ❶ de la Fig. 16-7). El grupo metilo del acetato se ha convertido en un metileno en el ácido cítrico. A continuación este ácido tricarboxílico experimenta fácilmente una serie de oxidaciones que eliminan dos carbonos en forma de CO_2. Observe que en todos los pasos en los que hay rotura o

formación de enlaces carbono-carbono (pasos ❶, ❸ y ❹) se aprovechan grupos carbonilo en la posición adecuada. Al igual que en todas las rutas metabólicas, hay una lógica química en la secuencia de pasos del ciclo del ácido cítrico: en cada paso se produce una oxidación conservadora de energía o es un preludio necesario para la oxidación, situando grupos funcionales en una posición que facilita la oxidación o la descarboxilación oxidativa. A medida que aprenda los pasos del ciclo, tenga presente la lógica química de cada uno de ellos; hará que el proceso sea más fácil de entender y recordar.

El ciclo del ácido cítrico consta de ocho pasos

Al examinar los ocho pasos consecutivos del ciclo del ácido cítrico, pondremos especial énfasis en las transformaciones químicas que tienen lugar cuando el citrato producido a partir de acetil-CoA y oxalacetato es oxidado dando lugar a la aparición de CO_2 al tiempo que la energía procedente de esta oxidación es almacenada en los coenzimas NADH y $FADH_2$ reducidos.

❶ Formación de citrato La primera reacción del ciclo es la condensación del acetil-CoA con **oxalacetato** para dar lugar a **citrato**, en una reacción catalizada por la **citrato sintasa:**



En esta reacción, el carbono metílico del grupo acetilo se une al grupo carbonílico (C-2) del oxalacetato. El citril-CoA es un intermediario transitorio que se forma en el sitio activo del enzima (véase la Fig. 16-9) y que se hidroliza rápidamente a CoA y citrato libres, que a continuación abandonan el sitio activo. La hidrólisis de este intermediario tioéster de elevada energía hace que la reacción directa sea muy exergónica. La gran variación negativa de energía libre estándar asociada con la reacción de la citrato sintasa resulta esencial para el funcionamiento del ciclo a consecuencia, tal como se mencionó anteriormente, de la muy baja concentración de oxalacetato normalmente presente. El CoA liberado en esta reacción se recicla para participar en la descarboxilación oxidativa de otra molécula de piruvato a cargo del complejo de la PDH.

Se ha cristalizado la citrato sintasa de mitocondrias y se ha deducido su estructura mediante difracción de rayos X en presencia y ausencia de sustratos e inhibidores **(Fig. 16-8)**. Cada subunidad del enzima homodimérico es una sola cadena polipeptídica con dos dominios, uno de ellos grande y rígido y el otro más pequeño y flexible. El sitio activo se sitúa entre los dos. El oxalacetato, primer sustrato que se une al enzima, induce un gran cambio de conformación en el dominio flexible que provoca la aparición de un sitio de unión para el segundo sustrato, el acetil-CoA. Cuando se ha formado el citril-CoA en el sitio activo del enzima, otro cambio conformacional produce la hidrólisis del tioéster con liberación de CoA-SH. Este encaje inducido del enzima, primero con su sustrato y a continuación con su intermedio, disminuye la probabilidad de una rotura prematura e improductiva del enlace tioéster del acetil-CoA. Estudios cinéticos sobre el enzima están de acuerdo con este mecanismo bisustrato ordenado (véase la Fig. 6-13) La reacción catalizada por la citrato sintasa es, básicamente, una condensación de Claisen, en la que interviene un tioéster (acetil-CoA) y una cetona (oxalacetato) **(Fig. 16-9)**.

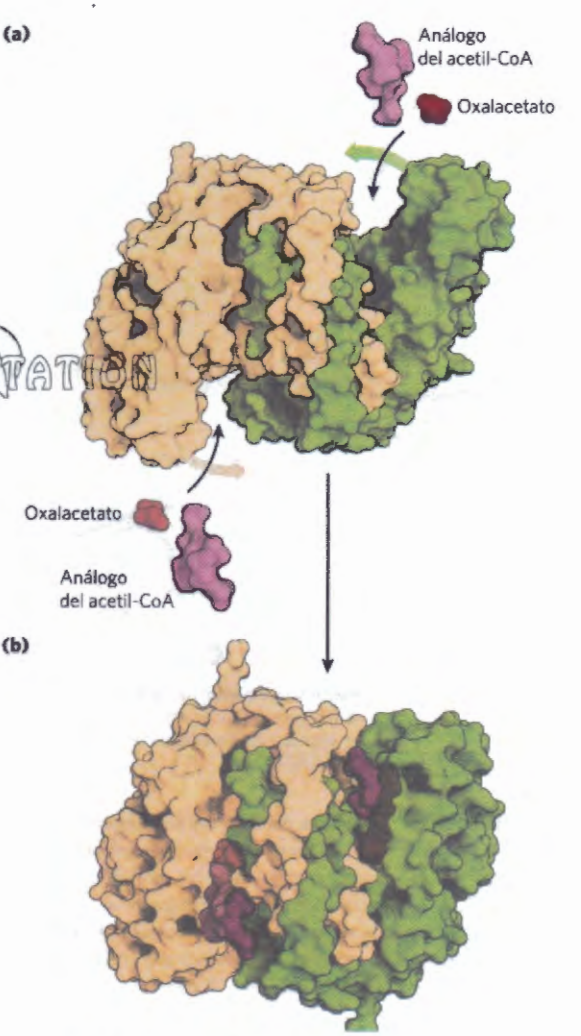
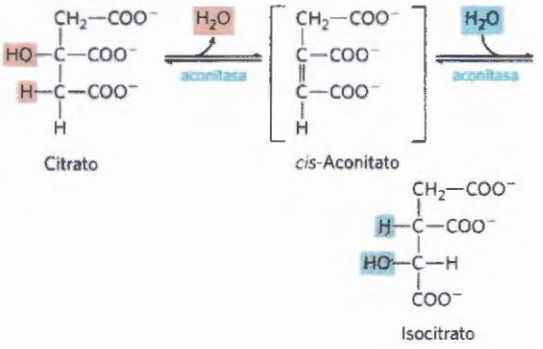


FIGURA 16-8 Estructura de la citrato sintasa. El dominio flexible de cada subunidad experimenta un gran cambio de conformación al unirse el oxalacetato con lo que se crea un sitio de unión para el acetil-CoA. **(a)** Forma abierta del enzima solo; **(b)** forma cerrada con oxalacetato y un análogo estable del acetil-CoA (carboximetil-CoA) unidos. En estas representaciones una subunidad se colorea en beige y la otra en verde. [Fuentes: **(a)** PDB ID 5CSC, D.-I. Liao et al., *Biochemistry* 30:6031, 1991. **(b)** Obtenido de PDB ID 5CTS, M. Karpusas et al., *Biochemistry* 29:2213, 1990.]

❷ Formación de isocitrato vía cis-aconitato El enzima **aconitasa** (denominado más formalmente **aconitato hidratasa**) cataliza la transformación reversible del citrato en **isocitrato** a través de la formación intermedia del ácido tricarboxílico ***cis*-aconitato**, que normalmente no se disocia del sitio activo. La aconitasa puede promover la adición reversible de H_2O al doble enlace del *cis*-aconitato unido al enzima mediante dos caminos diferentes, de los que uno conduce a citrato y el otro a isocitrato:

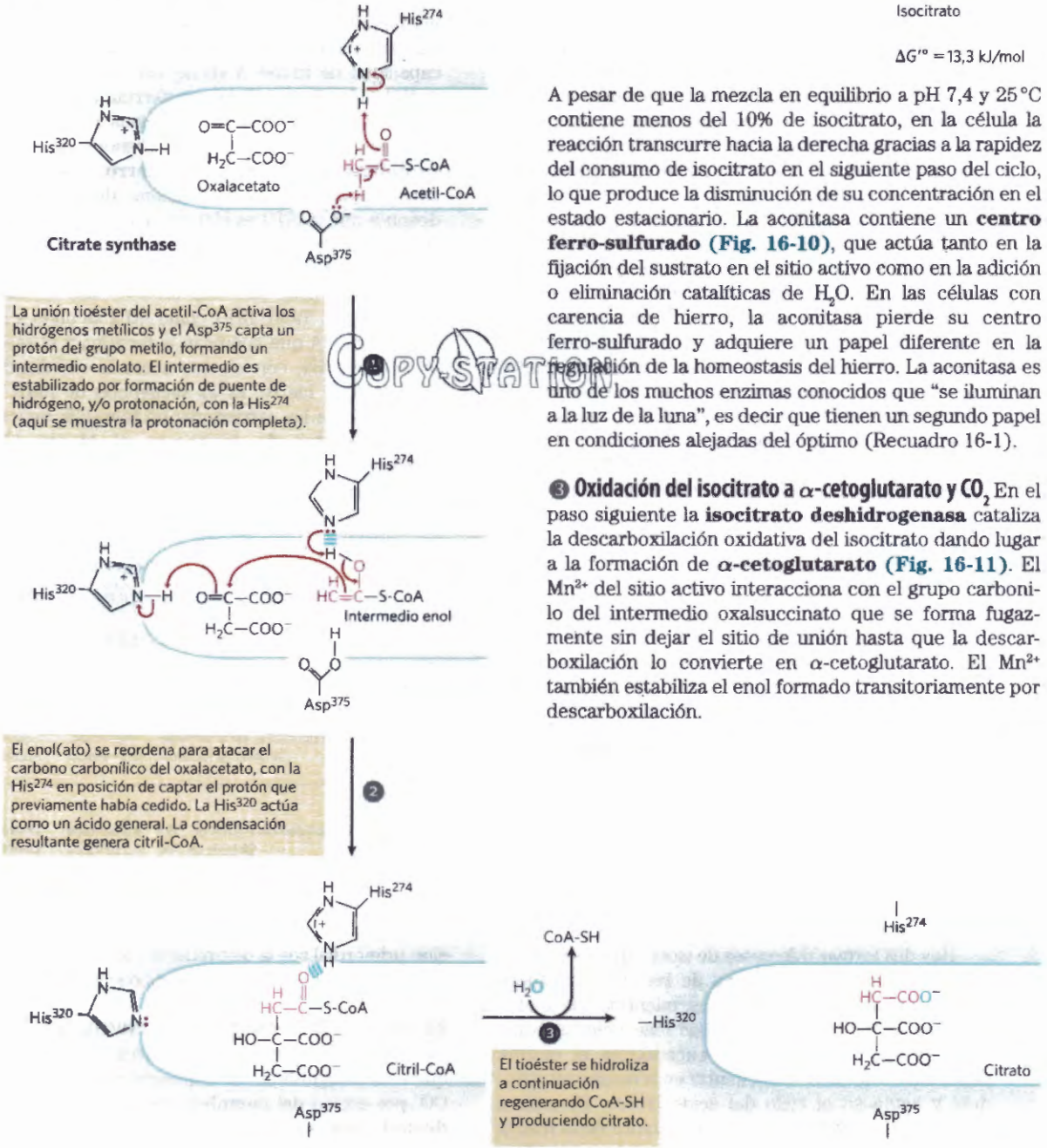


$\Delta G'^{\circ} = 13{,}3$ kJ/mol

A pesar de que la mezcla en equilibrio a pH 7,4 y 25 °C contiene menos del 10% de isocitrato, en la célula la reacción transcurre hacia la derecha gracias a la rapidez del consumo de isocitrato en el siguiente paso del ciclo, lo que produce la disminución de su concentración en el estado estacionario. La aconitasa contiene un **centro ferro-sulfurado (Fig. 16-10)**, que actúa tanto en la fijación del sustrato en el sitio activo como en la adición o eliminación catalíticas de H_2O. En las células con carencia de hierro, la aconitasa pierde su centro ferro-sulfurado y adquiere un papel diferente en la regulación de la homeostasis del hierro. La aconitasa es uno de los muchos enzimas conocidos que "se iluminan a la luz de la luna", es decir que tienen un segundo papel en condiciones alejadas del óptimo (Recuadro 16-1).

❸ Oxidación del isocitrato a α-cetoglutarato y CO_2 En el paso siguiente la **isocitrato deshidrogenasa** cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato dando lugar a la formación de **α-cetoglutarato (Fig. 16-11)**. El Mn^{2+} del sitio activo interacciona con el grupo carbonilo del intermedio oxalsuccinato que se forma fugazmente sin dejar el sitio de unión hasta que la descarboxilación lo convierte en α-cetoglutarato. El Mn^{2+} también estabiliza el enol formado transitoriamente por descarboxilación.

FIGURA DE MECANISMO 16-9 Citrato sintasa. En la reacción de la citrato sintasa de mamíferos, el oxalacetato se une en primer lugar, en una secuencia de reacción estrictamente ordenada. Esta unión desencadena un cambio de conformación que abre el sitio de unión para el acetil-CoA. El oxalacetato se orienta específicamente en el sitio activo de la citrato sintasa por interacción de sus dos carboxilatos con dos residuos Arg cargados positivamente (no mostrados). [Fuente: Información de S. J. Remington, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:730, 1992.]



COPY-STATION

RECUADRO 16-1 Enzimas "claro de luna": proteínas con más de una función

El aforismo "un gen-un enzima", propuesto por George Beadle y Edward Tatum en 1940 (véase el Capítulo 24) no se puso en entredicho durante gran parte del siglo XX, lo mismo que la presunción asociada de que cada proteína tenía una única función. Pero en los últimos años se han descubierto muchas excepciones importantes a esta fórmula sencilla, casos en los que una única proteína codificada por un único gen realizaba claramente más de una función en la célula ("**moonlighting**"). La aconitasa es una de estas proteínas: actúa como un enzima al mismo tiempo que como reguladora de la síntesis de proteínas.

Las células eucarióticas tienen dos isozimas de la aconitasa. El isozima mitocondrial convierte el citrato en isocitrato en el ciclo del ácido cítrico. El isozima citosólico tiene dos funciones distintas. Cataliza la conversión del citrato en isocitrato, proporcionando el sustrato para una isocitrato deshidrogenasa citosólica que genera NADPH como poder reductor para la síntesis de ácidos grasos y otros procesos anabólicos en el citosol. También tiene un papel en la homeostasis celular del hierro.

Todas las células han de obtener hierro para la actividad de muchas proteínas que lo requieren como cofactor. En los humanos la carencia grave de hierro provoca anemia, un suministro insuficiente de eritrocitos y una capacidad reducida de transporte de oxígeno que puede poner en peligro la vida. Demasiado hierro también es nocivo: se acumula en el hígado dañándolo en la hemocromatosis y en otras enfermedades. El hierro obtenido de la diera se transporta en la sangre por la proteína **transferrina** y entra en las células mediante endocitosis facilitada por el receptor de la transferrina. Una vez en el interior de las células el hierro se utiliza en la síntesis de los distintos hemos, citocromos, proteínas Fe-S y otras proteínas dependientes de hierro, al tiempo que el exceso de hierro se almacena unido a la proteína **ferritina**. Los niveles de **transferrina**, **receptor de la transferrina** y **ferritina** son, por tanto, básicos para la homeostasis celular del hierro. La síntesis de estas proteínas está regulada en función de la asequibilidad del hierro y la aconitasa, en su función al "claro de luna", es decir con una actividad tenue, juega un papel regulador.

La aconitasa tiene un agrupamiento Fe-S en su sitio activo (véase la Fig. 16-10). Cuando una célula no tiene hierro, este agrupamiento Fe-S se disocia y el enzima pierde su actividad aconitasa. Pero el apoenzima (apoaconitasa, carente del agrupamiento Fe-S) así formado ha adquirido ahora su segunda actividad: la capacidad de unirse a secuencias específicas de los mRNA del receptor de la transferrina y de la ferritina, regulando así la síntesis de proteínas a nivel de la traducción. Se descubrieron independientemente dos **proteínas reguladoras del hierro, IRP1** e **IRP2**, como reguladoras del metabolismo del hierro. Se vio después que la IRP1 es idéntica a la apoaconitasa citosólica y que la IRP2 está muy relacionada en estructura y función con la IRP1, si bien, a diferencia de la IRP1 no se puede convertir en aconitasa enzimáticamente activa. Tanto IRP1 como IRP2 se unen a regiones del mRNA que codifican la ferritina y el receptor de transferrina, con efectos sobre la movilización y captación de hierro. Estas secuencias de mRNA forman parte de las estructuras en horquilla denominadas **elementos de respuesta al hierro (IRE)**, localizadas en los extremos 5' y 3' de los mRNA (Fig. 1). Cuando están unidas a la secuencia 5' sin traducir

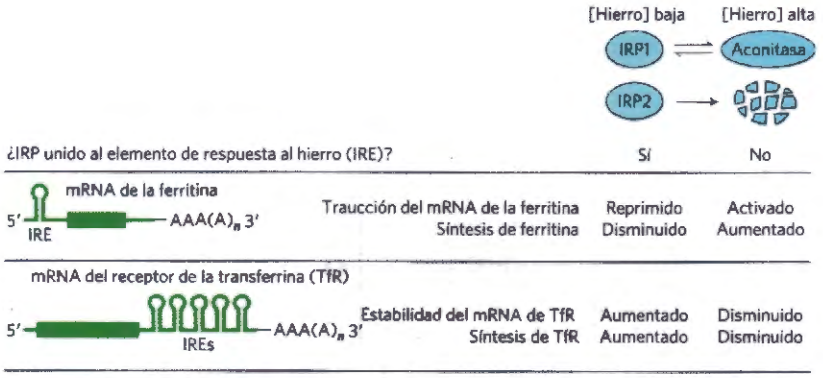


FIGURA 1 Efecto de IRP1 e IRP2 sobre los mRNA de ferritina y del receptor de la transferrina. [Fuente: Información de R. S. Eisenstein, *Annu. Rev. Nutr.* 20:627, 2000, Fig. 1]

Hay dos formas diferentes de isocitrato deshidrogenasa en todas las células, una de las cuales requiere NAD^+ como aceptor de electrones, mientras que la otra requiere $NADP^+$. Por lo demás, las reacciones globales son idénticas. En las células eucarióticas el enzima dependiente de NAD se encuentra en la matriz mitocondrial y actúa en el ciclo del ácido cítrico. El enzima dependiente de NADP se encuentra tanto en la matriz mitocondrial como en el citosol. Es posible que su función primordial sea la de producir NADPH, que es esencial en reacciones reductoras anabólicas.

❹ Oxidación del α-cetoglutarato a succinil-CoA y CO_2. El paso siguiente es otra descarboxilación oxidativa por la que el α-cetoglutarato se convierte en **succinil-CoA** y CO_2 por acción del **complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa**; el NAD^+ actúa como aceptor de electrones y el CoA es el transportador del grupo succinilo.

del IRE en el mRNA de la ferritina, las IRP bloquean la síntesis de ferritina; cuando están unidas a las secuencias 3' no traducidas de los IRE en el mRNA del receptor de la transferrina, estabilizan el mRNA e impiden su degradación, permitiendo así la síntesis de más copias de la proteína receptora por molécula de mRNA. De este modo, en células con carencia de hierro, la captación de hierro es más eficiente y se reduce el almacenamiento de hierro (unido a ferritina). Cuando las concentraciones celulares de hierro vuelven a la normalidad, IRP1 se convierte en aconitasa e IRP2 experimenta degradación proteolítica acabando la respuesta a la baja concentración de hierro.

La aconitasa enzimáticamente activa y la tenue apoaconitasa reguladora tienen estructuras diferentes. Al igual que la aconitasa activa la proteína tiene dos lóbulos que se cierran alrededor del agrupamiento Fe-S; al igual que IRP1 los dos lóbulos se abren exponiendo el sitio de unión del mRNA (Fig. 2).

La aconitasa es sólo uno de un número creciente de enzimas conocidos (o que se suponen) que tienen un segundo papel más tenue. En este grupo se incluyen muchos de los enzimas glucolíticos. La piruvato quinasa actúa en el nucleo regulando la transcripción de genes que responden a la hormona tiroidea. La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa tiene una actividad secundaria como uracilo DNA glucosilasa, efectuando la reparación del DNA dañado y como regulador de la transcripción de la histona H2B. El cristalino del ojo de los vertebrados tiene varios enzimas glucolíticos con funciones secundarias entre los que se cuentan la fosfoglicerato quinasa, la triosa fosfato isomerasa y la lactato deshidrogenasa. Este fenómeno se denomina a veces compartir genes: dos proteínas diferentes, con papeles funcionales diferentes, están codificadas por un único gen. La propuesta de Beadle y Tatum "un gen-un enzima" al igual que muchas otras propuestas en ciencia es solo aproximadamente verdadera.

Hasta hace poco el descubrimiento de que una proteína tiene más de una función era cuestión del azar: dos grupos de investigadores que estudiaban dos cuestiones no relacionadas descubrieron que "sus" proteínas tenían propiedades similares, las compararon cuidadosamente y vieron que eran idénticas. Con el crecimiento de bases de datos catalogadas de secuencias de proteínas y de DNA se puede ahora buscar directamente proteínas con funciones secundarias explorando las bases de datos en busca de proteínas con la misma secuencia que la proteína objeto de estudio, pero con una función diferente. Esto quiere decir que en las bases de datos, una proteína a la que se ha adscrito una función determinada no necesariamente tiene sólo esta función. Esta variedad de funciones de una proteína puede explicar también algunos hallazgos sorprendentes: experimentos en los que una proteína con una función conocida se inactiva por mutación pero los organismos mutantes resultantes muestran un fenotipo que no tiene una relación evidente con aquella función.

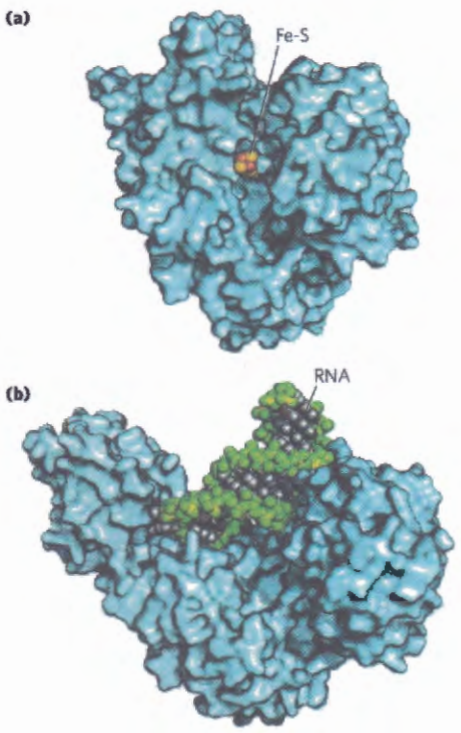


FIGURA 2 Dos formas de la aconitasa/IRP1 citosólica con dos funciones distintas. **(a)** En la aconitasa, los dos lóbulos principales están cerrados y el agrupamiento Fe-S está enterrado; la proteína se ha transparentado aquí para mostrar el agrupamiento Fe-S. **(b)** En IRP1, los lóbulos se abren exponiendo un sitio de unión para la horquilla del mRNA del sustrato. [Fuentes: (a) PDB ID 2B3Y, J. Dupuy et al., *Structure* 14:129, 2006. (b) PDB ID 2IPY, W. E. Walden et al., *Science* 314:1903, 2006.]

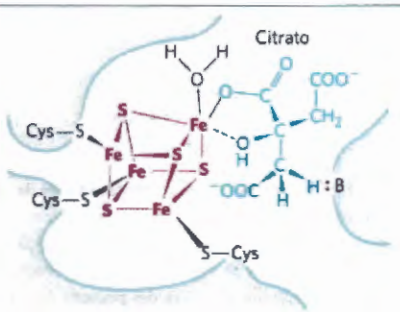
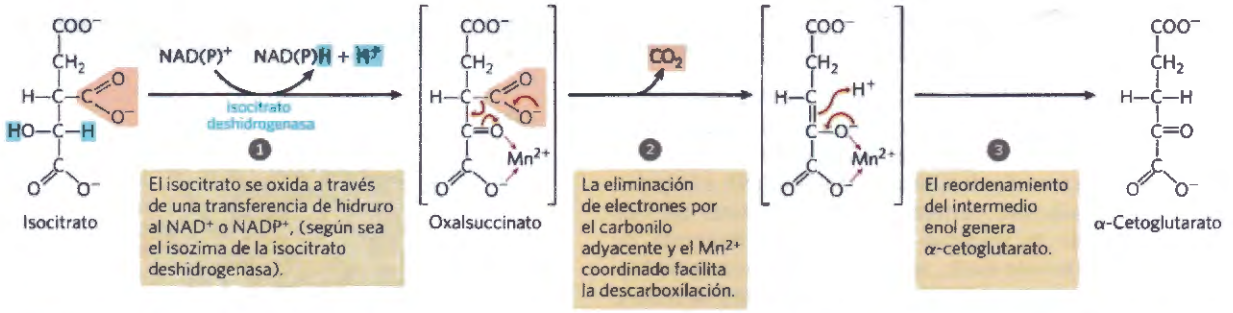
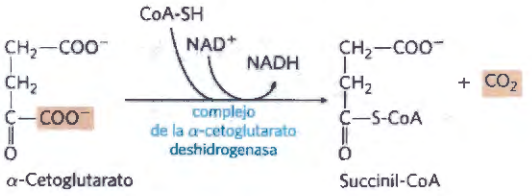


FIGURA 16-10 Centro ferro-sulfurado de la aconitasa. El centro ferro-sulfurado está en rojo y la molécula de citrato en azul. Tres residuos Cys del enzima unen tres átomos de hierro; el cuarto hierro está unido a uno de los grupos carboxilo del citrato y también interacciona de modo no covalente con un grupo hidroxilo del citrato (enlace a trazos). Un residuo básico, (:B), en el enzima ayuda a posicionar el citrato en el sitio activo. El centro ferro-sulfurado actúa tanto en la unión del sustrato como en la catálisis. Las propiedades generales de las proteínas ferro-sulfuradas se estudian en el Capítulo 19 (véase la Fig. 19-5).



MECANISMO FIGURA 16-11 Isocitrato deshidrogenasa. En esta reacción el sustrato, isocitrato, pierde un carbono por descarboxilación oxidativa.Véase la Fig. 14-14 para más información sobre las reacciones de transferencia de hidruro en las que intervienen NAD^+ y $NADP^+$.

La energía de oxidación del α-cetoglutarato se conserva gracias a la formación del enlace tioéster del succinil-CoA:



$\Delta G'^{\circ} = -33{,}5$ kJ/mol

Esta reacción es virtualmente idéntica a la reacción de la piruvato deshidrogenasa discutida anteriormente, y a la secuencia de reacciones responsable de la degradación de aminoácidos de cadena ramificada (Fig. 16-12). El complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa es muy parecido al complejo de la PDH tanto en estructura como en función. Posee tres enzimas homólogos a E_1, E_2 y E_3 del complejo de la PDH, así como TPP unido al enzima y también lipoato, FAD, NAD y coenzima A. Ciertamente, ambos complejos provienen de un antepasado evolutivo común. A pesar de que los componentes E_1 de los dos complejos son estructuralmente similares, sus secuencias de aminoácidos son diferentes y tienen, por supuesto, diferente especificidad de unión: E_1 del complejo de la PDH une piruvato, y E_1 del complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa une α-cetoglutarato. Los componentes E_2 de los dos complejos son también muy similares; ambos poseen grupos lipoilo unidos covalentemente. Las subunidades E_3 de los dos complejos enzimáticos son idénticas. El complejo que degrada los α-cetoácidos de cadena ramificada cataliza la misma secuencia de reacciones utilizando los mismos cinco cofactores. Es éste un caso claro de duplicación génica y posterior **evolución divergente**, tal como se describe en la Figura 1-34. Por ejemplo, si evolucionó primero el complejo de la piruvato deshidrogenasa, la duplicación de los genes que codifican E_1 y E_2 habría proporcionado "copias extra" que podrían mutar a lo largo del tiempo. La mutaciones conducirían finalmente a un enzima que utilizaría el mismo mecanismo para la descarboxilación oxidativa, pero con una nueva especificidad de sustrato (para el α-cetoglutarato) que ofrecía una ventaja selectiva. Estos enzimas relacionados pueden emplear la misma subunidad E_3 porque el sustrato de E_3 –un lipoato reducido– es el mismo para ambos complejos.

COPY-STATION

❺ Conversión del succinil-CoA en succinato El succinil-CoA, al igual que el acetil-CoA, tiene un enlace tioéster con una energía libre estándar de hidrólisis altamente negativa ($\Delta G'^{\circ} \approx -36$ kJ/mol). En el paso siguiente del ciclo del ácido cítrico, la energía liberada en la rotura de este enlace se utiliza para promover la síntesis

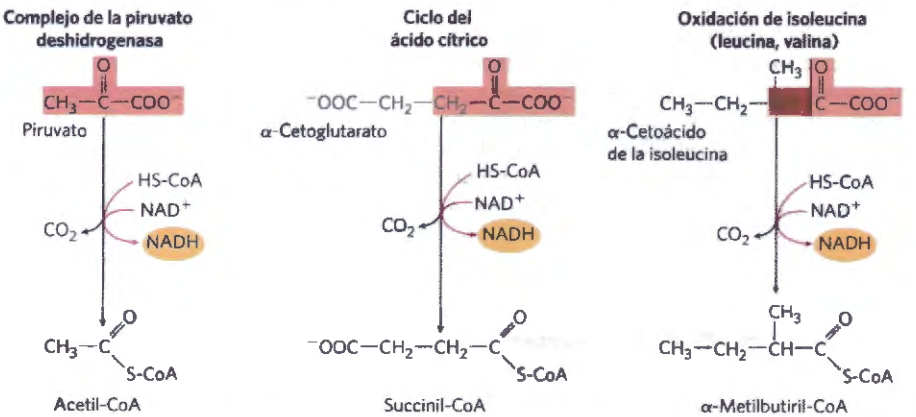


FIGURA 16-12 Un mecanismo conservado de la descarboxilación oxidativa. Las rutas mostradas emplean los mismos cinco cofactores (tiamina pirofosfato, coenzima A, lipoato, FAD y NAD^+), complejos enzimáticos muy similares y el mismo mecanismo enzimático para llevar a cabo la descarboxilación oxidativa del piruvato (por el complejo de la piruvato deshidrogenasa), el α-cetoglutarato (en el ciclo del ácido cítrico) y el esqueleto carbonado de los tres aminoácidos ramificados isoleucina (mostrado aquí), leucina y valina. Una cuarta reacción, catalizada por la glicina descarboxilasa transcurre mediante un mecanismo muy parecido (véase la Fig. 20-49).

RECUADRO 16-2 Sintasas y sintetasas; ligasas y liasas; quinasas, fosfatasas y fosforilasas: sí, ¡una nomenclatura confusa!

La citrato sintasa es uno de los muchos enzimas que catalizan reacciones de condensación, dando un producto más complejo desde el punto de vista químico que sus precursores. Las **sintasas** catalizan reacciones de condensación en las que no se requiera ningún nucleósido trifosfato (ATP, GTP, etc.) como fuente energética. Las **sintetasas** catalizan condensaciones que *sí* utilizan ATP u otro nucleósido trifosfato como fuente de energía para la reacción de síntesis. La succinil-CoA sintetasa es un ejemplo de estos enzimas. Las **ligasas** (del latin *ligare*, 'unir') son enzimas que catalizan reacciones de condensación en las que dos átomos son unidos utilizando la energía del ATP u otra fuente energética. (Así pues, las sintetasas son ligasas). La DNA ligasa, por ejemplo, une los cortes que encuentra en moléculas de DNA con la energia proporcionada por el ATP o el NAD^+; es ampliamente utilizada en la unión de fragmentos de DNA en ingeniería genética. Las ligasas no deben ser confundidas con las **liasas**, que catalizan roturas (o en el sentido inverso, adiciones) en las que tienen lugar reordenamientos electrónicos. El complejo de la PDH, que escinde oxidativamente CO_2 a partir de piruvato, es un miembro de esta gran familia de enzimas.

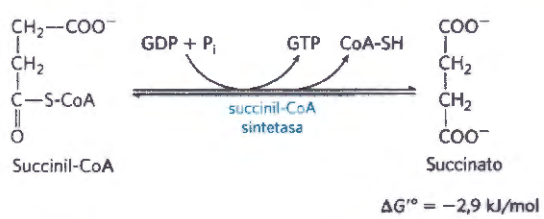
El nombre **quinasa** se aplica a enzimas que transfieren un grupo fosforilo desde un nucleósido trifosfato tal como el ATP a una molécula aceptora – un azúcar (como en la hexoquinasa y en la glucoquinasa), una proteína (como en la glucogéno fosforilasa quinasa), otro nucleótido (como en la nucleósido difosfato quinasa), o un intermediario metabólico tal como el oxalacetato (en la PEP carboxiquinasa). La reacción catalizada por una quinasa es una *fosforilación*. Por otro lado, la *fosforólisis* es una reacción de desplazamiento en la que el fosfato es la especie atacante que se une covalentemente al punto de rotura de enlace. Estas reacciones estan catalizadas por **fosforilasas**. La glucógeno fosforilasa, por ejemplo, cataliza la fosforólisis del glucógeno, produciendo glucosa 1-fosfato. La *desfosforilación*, eliminación de un grupo fosforilo de un éster fosfato en la que el agua es la especie atacante, está catalizada por **fosfatasas**. La fructosa bisfosfatasa-1 convierte la fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato en la gluconeogénesis, y la fosforilasa *a* fosfatasa elimina grupos fosforilo de las fosfoserinas de la glucógeno fosforilasa fosforilada. ¡Guau!

Desgraciadamente, estas descripciones de las clases de enzimas se solapan y muchos son denominados por dos o más nombres. La succinil-CoA sintetasa, por ejemplo, es conocida también como succinato tioquinasa; el enzima es una sintetasa en el ciclo del ácido cítrico y una quinasa cuando actúa en la dirección de la síntesis de succinil-CoA. Esto origina una nueva fuente de confusión en la nomenclatura de los enzimas. Un enzima puede haber sido descubierto gracias a un ensayo enzimático en el que, por ejemplo, A se convierte en B. El enzima recibe entonces un nombre por dicha reacción. Sin embargo, se puede llegar a demostrar en trabajos posteriores que en la célula el enzima actúa mayoritariamente convirtiendo B en A. Normalmente, continúa utilizándose el nombre inicial aún cuando el papel metabólico del enzima estaría mejor descrito si lo llamáramos en virtud de la reacción opuesta. El enzima glucolítico piruvato quinasa ilustra esta situacion. Para un principiante en el campo de la bioquímica, esta duplicación de la nomenclatura puede ser desconcertante. Comités internacionales han hecho esfuerzos heroicos para sistematizar la nomenclatura enzimática (véase la Tabla 6-3 para un breve resumen del sistema), pero algunos nombres sistemáticos han demostrado ser demasiado largos, de dificil manejo y de uso no muy frecuente en conversaciones bioquímicas.

Hemos intentado a lo largo de este libro utilizar para cada enzima el nombre más frecuentemente utilizado entre los bioquímicos y señalar aquellos casos en los que recibe más de un nombre común. Para información más actualizada sobre la nomenclatura enzimática diríjase a las recomendaciones de The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

COPYRIGHTED MATERIAL

de un enlace fosfoanhídrido del GTP o del ATP con una $\Delta G'^{\circ}$ neta de sólo –2,9 kJ/mol. En el proceso se forma **succinato:**



El enzima que cataliza esta reacción reversible se conoce como **succinil-CoA sintetasa** o **succínico tioquinasa;** ambos nombres indican la participación de un nucleósido trifosfato en la reacción (Recuadro 16-2).

Esta reacción conservadora de energía presenta un paso intermedio en el que la misma molécula de enzima queda fosforilada en un residuo His en el sitio activo **(Fig. 16-13a)**. Este grupo fosforilo, que posee un elevado potencial de transferencia de grupo, es transferido a ADP (o GDP) para formar ATP (o GTP). Las células animales tienen dos isozimas de la succinil-CoA sintetasa, uno específico para ADP, y otro para GDP. El enzima tiene dos subunidades, α (M_r 32.000), que contiene el residuo Ⓟ-His (His^{246}) y el sitio de unión para el CoA, y la β (M_r 42.000), que confiere especificidad por ADP o GDP. El sitio activo se halla en la interfase entre subuni-

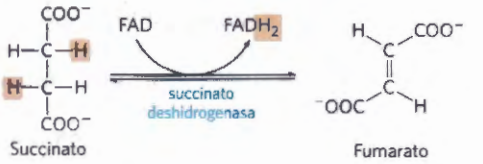
dades. La estructura cristalina de la succinil-CoA sintetasa revela la presencia de dos "hélices motoras" (una en cada subunidad), orientadas de manera que sus dipolos eléctricos exponen cargas positivas parciales cerca de la Ⓟ-His cargada negativamente (Fig. 16-13b), estabilizando el intermedio fosfoenzimático. (Recuerde el papel similar de los dipolos de hélice al estabilizar los iones K^+ en el canal de K^+; véase la Fig 11-45).

La formación de ATP (o GTP) a expensas de la energía liberada por la descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato es una fosforilación a nivel de sustrato, como la síntesis de ATP en las reacciones glucolíticas catalizadas por la fosfoglicerato quinasa y la piruvato quinasa (véase la Fig. 14-2). El GTP formado por la succinil-CoA sintetasa puede donar su grupo fosfato terminal al ADP para formar ATP, en una reacción reversible catalizada por la **nucleósido difosfato quinasa**:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP \qquad \Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

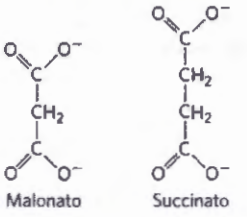
Así, el resultado neto de la actividad de los dos isozimas de la succinil-CoA sintetasa es la conservación de la energía en forma de ATP. No hay ninguna variación de energía libre en la reacción de la nucleósido difosfato quinasa; el ATP y el GTP son energéticamente equivalentes.

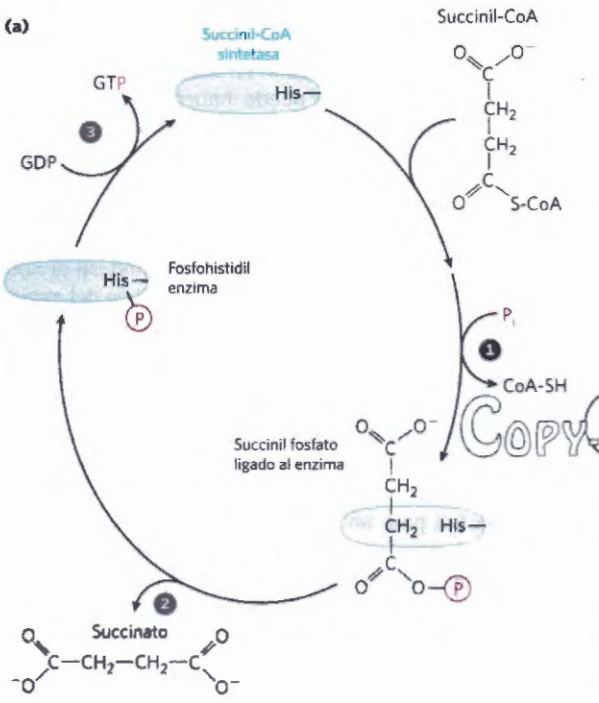
❻ Oxidación del succinato a fumarato El succinato formado a partir de succinil-CoA se oxida a **fumarato** por la flavoproteína **succinato deshidrogenasa**:



$\Delta G'^{\circ} = 0$ kJ/mol

En eucariotas, la succinato deshidrogenasa es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna; en bacterias, a la membrana plasmática. El enzima contiene tres agrupaciones de hierro-azufre diferentes y una molécula de FAD unida covalentemente (véase la Fig. 19-9). Los electrones pasan desde el succinato a través del FAD y los centros ferro-sulfurados antes de entrar en la cadena de transportadores electrónicos en la membrana mitocondrial interna (la membrana plasmática en bacterias). El flujo de electrones a través de estos transportadores desde el succinato hasta el aceptor final, el O_2, está acoplado a la síntesis de aproximadamente 1,5 moléculas de ATP por par de electrones (fosforilación ligada a la respiración). El malonato, un análogo del succinato que no se encuentra normalmente en las células, es un fuerte inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa y por lo tanto su adición a la mitocondria bloquea el ciclo del ácido cítrico.





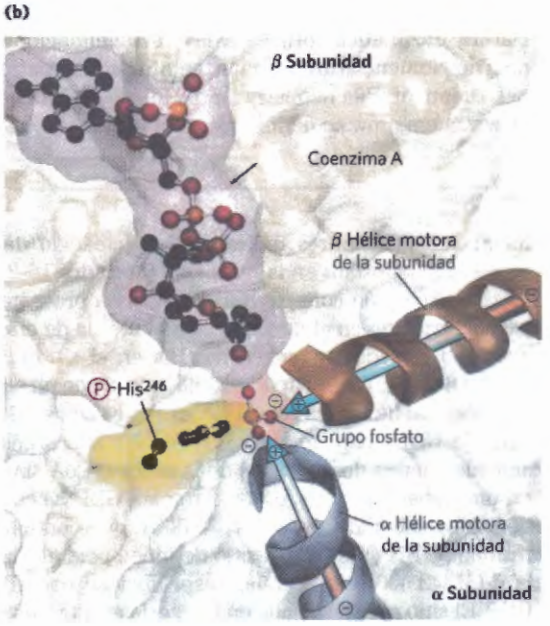
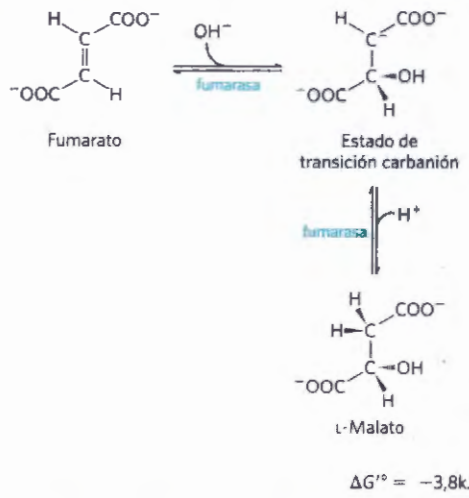


FIGURA 16-13 Reacción de la succinil-CoA sintetasa. (a) En el paso ❶ un grupo fosforilo sustituye al CoA del succinil-CoA unido al enzima, formando un acil fosfato de alta energía. En el paso ❷ el succinil fosfato dona su grupo fosforilo a un residuo His del enzima, formando un fosfohistidil enzima de elevada energía. En el paso ❸ el grupo fosforilo se transfiere desde el residuo His al fosfato terminal del GDP (o ADP), formando GTP (o ATP). **(b)** Sitio activo de la succinil-CoA sintetasa de *E coli* (de PDB ID 1SCU). El sitio activo incluye parte de las subunidades α (azul) y β (marrón). Las hélices motoras (azul, marrón) sitúan las cargas positivas parciales del dipolo helicoidal cerca del grupo fosfato de Ⓟ-His^{246} de la cadena α, estabilizando el fosfohistidil enzima. Los enzimas bacteriano y de mamíferos presentan secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales parecidas. [Fuente: Obtenido de PDB ID 1SCU, W. T. Wolodko et al., *J. Biol. Chem.* 269:10.883, 1994.]

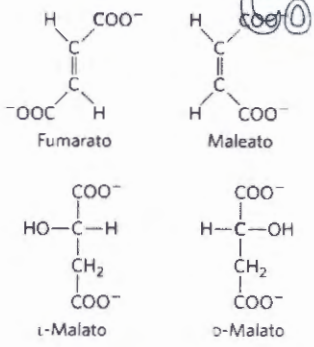
Copy-Station

❼ Hidratación del fumarato a malato La hidratación reversible del fumarato a L-**malato** está catalizada por la **fumarasa** (formalmente **fumarato hidratasa**). El estado de transición en esta reacción es un carbanión:

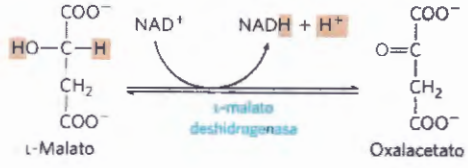


$\Delta G'^{\circ} = -3{,}8$ kJ/mol

Este enzima es altamente estereoespecífico; cataliza la hidratación del doble enlace en trans del fumarato, pero no el doble enlace en cis del maleato . En la dirección inversa (de L-malato a fumarato), la fumarasa es igualmente estereoespecífica: el D-malato no es un sustrato.



❽ Oxidación del malato a oxalacetato En la última reacción del ciclo del ácido cítrico, la **L-malato deshidrogenasa** cataliza la oxidación del L-malato a oxalacetato, acoplada a la reducción del NAD^+ a NADH:



$\Delta G'^{\circ} = -29{,}7$ kJ/mol

El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la izquierda en condiciones termodinámicas estándar, pero en células intactas el oxalacetato es eliminado continuamente por la reacción altamente exergónica de la citrato sintasa (paso ❷ de la Fig. 16-7). Esto mantiene la concentración intracelular de oxalacetato extremadamente baja ($<10^{-6}$ M), lo que empuja la reacción de la malato deshidrogenasa hacia la formación de oxalacetato.

Aunque las reacciones individuales del ciclo del ácido cítrico fueron deducidas inicialmente in vitro utilizando tejido muscular desmenuzado, la vía y su regulación han sido también estudiadas extensamente in vivo . Utilizando precursores marcados radiactivamente con ^{14}C, los investigadores han trazado el destino de los átomos de carbono individuales a través del ciclo del ácido cítrico. Algunos de los primeros experimentos con ^{14}C produjeron, sin embargo, un resultado inesperado y conllevaron una considerable controversia sobre la vía y el mecanismo del ciclo del ácido cítrico. De hecho estos experimentos parecían confirmar al principio que el citrato no era el primer ácido tricarboxílico formado. El recuadro 16-3 da algunos detalles sobre este episodio en la historia de la investigación del ciclo del ácido cítrico. El flujo metabólico a través del ciclo puede ser ahora seguido en tejido vivo utilizando precursores marcados con el isótopo ^{13}C, y espectroscopia RMN del tejido entero. Debido a que la señal de RMN es única para el compuesto que contiene ^{13}C , los bioquímicos pueden seguir el movimiento de los átomos de carbono precursores hasta cada intermediario del ciclo, y hasta los compuestos derivados de estos intermediarios. Es una técnica muy prometedora para el estudio de la regulación del ácido cítrico y sus interconexiones con otras vias metabólicas tales como la glucólisis.

La energía de las oxidaciones del ciclo se conserva eficientemente

COPY-STATION

Hemos cubierto hasta ahora una vuelta completa al ciclo del ácido cítrico **(Fig. 16-14)**. Un grupo acetilo de dos átomos de carbono entró en el ciclo combinándose con el oxalacetato. Dos átomos de carbono salieron del ciclo como CO_2 debido a la oxidación del isocitrato y el α-cetoglutarato. La energía liberada en estas oxidaciones se conservó reduciendo tres NAD^+ y un FAD, y la producción de un ATP o GTP. Al final del ciclo se regeneró una molécula de oxalacetato. Obsérvese que los dos átomos de carbono que aparecen como CO_2 no son los mismos átomos de carbono que entraron en forma de grupo acetilo; se precisan más vueltas alrededor del ciclo para liberar estos átomos de carbono como CO_2 (Fig. 16-7).

A pesar de que el ciclo del ácido cítrico en sí genera directamente sólo un ATP por vuelta (en la conversión de succinil-CoA a succinato), los cuatro pasos de oxidación en el ciclo proporcionan un gran flujo de electrones hacia la cadena respiratoria vía NADH y $FADH_2$ y así posibilita la formación de un gran número de moléculas de ATP durante la fosforilación oxidativa.

En el capítulo 14 vimos que la producción de dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa en la glucólisis rinde 2 ATP y 2 NADH. En la fosforilación oxidativa (Capítulo 19), el paso de dos electrones desde el NADH al O_2 conduce a la formación de unos 2,5 ATP, y el paso de dos electrones desde el $FADH_2$ al O_2 rinde alrededor de 1,5 ATP. Esta estequiometría nos permite calcular el rendimiento global de ATP en la oxidación completa de la glucosa. Cuando ambas moléculas de piruvato se oxidan a seis CO_2 vía el complejo de la piruvato deshidrogenasa y el ciclo del

RECUADRO 16-3 Citrato: una molécula simétrica que reacciona asimétricamente

Hace ahora unos 60 años, se pudo obtener compuestos enriquecidos con el isótopo pesado del carbono ^{13}C y con los isótopos radiactivos ^{11}C y ^{14}C. Fue a partir de ese momento que se emplearon para realizar el seguimiento de los átomos de carbono a lo largo del ciclo del ácido cítrico. Uno de los experimentos llevados a cabo, inició la controversia acerca del papel del citrato. Se incubó aeróbicamente acetato, cuyo grupo carboxilo había sido marcado radiactivamente (designado como [1-^{14}C] acetato), con un preparado de tejido animal. El acetato se convierte enzimáticamente en acetil-CoA en tejidos animales, y el camino recorrido dentro del ciclo por el carbono carboxílico marcado del grupo acetilo, pudo ser seguido en las reacciones del ciclo. Se aisló α-cetoglutarato del tejido después de la incubación y a continuación se degradó a partir de reacciones químicas conocidas con tal de establecer la posición (o posiciones) del carbono isotópico.

A partir de la condensación de oxalacetato no marcado, con acetato cuyo grupo carboxílico está marcado cabría esperar obtener citrato marcado en uno de los dos grupos carboxilo primarios. La molécula de citrato es simétrica, con sus dos grupos carboxílicos terminales químicamente indistinguibles. Así pues, se esperaba que la mitad de la moléculas de citrato marcadas acabaran dando α-cetoglutarato marcado en el grupo α-carboxílico y que la otra mitad diera lugar a α-cetoglutarato marcado en el grupo g-carboxílico; es decir, γ-. Sin embargo, el α-cetoglutarato formado debería ser una mezcla de los dos tipos de moléculas marcadas (Fig.1, rutas ❶ y ❷). Contrariamente a lo esperado, el α-cetoglutarato aislado de la suspensión de tejido contenía ^{14}C únicamente en el grupo g-carboxílico (Fig.1, vía ❶). Los investigadores concluyeron que el citrato (o cualquier otra molécula simétrica) no podía ser un intermediario en la vía metabólica que transfoma acetato en α-cetoglutarato, antes bien, un ácido tricarboxílico asimétrico, probablemente *cis*-aconitato o isocitrato, debía ser el primer producto formado a partir de la condensación de acetato con oxalacetato.

Sin embargo, en 1948 Alexander Ogston señaló que a pesar de que el citrato no posee ningún centro quiral (véase la Fig. 1-21), tiene el *potencial* para reaccionar asimétricamente si el enzima con el que interacciona presenta un sitio activo asimétrico. Sugirió que el sitio activo de la aconitasa tendría tres puntos de anclaje por los que la molécula de citrato quedaría unida y que el citrato ha de experimentar una unión específica a estos sitios de unión. Como se ve en la Figura 2, la unión del citrato a esos tres puntos de anclaje sólo podría darse de una única manera, y esto explicaría la obtención de un solo tipo de α-cetoglutarato marcado. Moléculas orgánicas tales como el citrato que no presentan un centro quiral pero que son potencialmente capaces de reaccionar asimétricamente con un sitio activo asimétrico se denominan actualmente **moléculas proquirales**.

Copy Station

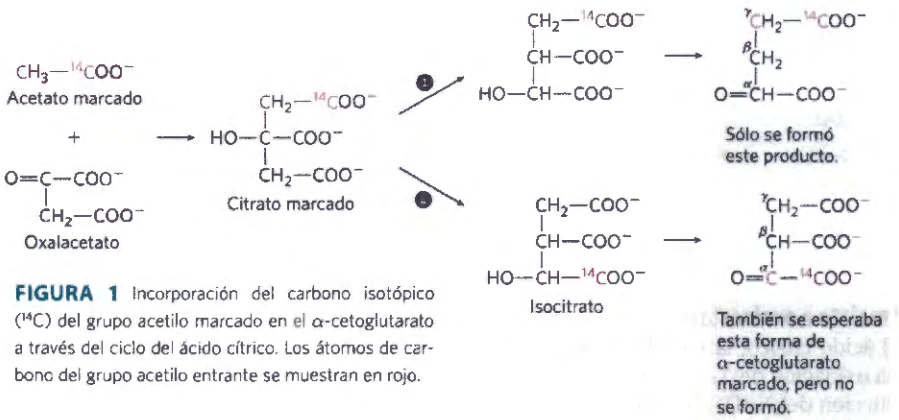


FIGURA 1 Incorporación del carbono isotópico (^{14}C) del grupo acetilo marcado en el α-cetoglutarato a través del ciclo del ácido cítrico. Los átomos de carbono del grupo acetilo entrante se muestran en rojo.

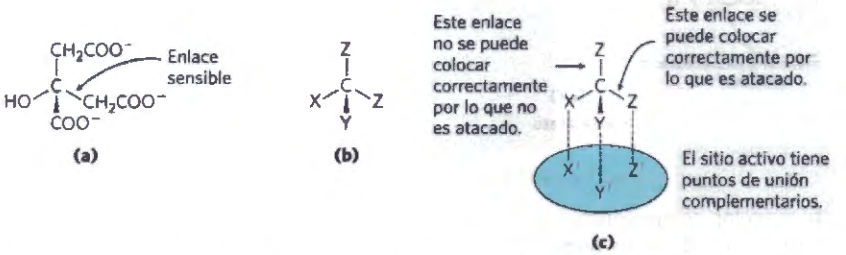


FIGURA 2 Naturaleza proquiral del citrato. **(a)** Estructura del citrato; **(b)** representación esquemática del citrato: X = —OH; Y = —COO^-; Z = —CH_2COO^-. **(c)** Encaje complementario correcto del citrato en el sitio activo de la aconitasa. Sólo existe una manera en la que los tres grupos especificados del citrato pueden encajar en los tres puntos del sitio de unión. De este modo sólo uno de los dos grupos —CH_2COO^- está unido a la aconitasa.

TABLA 16-1 Estequiometría de la reducción de coenzimas y de formación de ATP en la oxidación aeróbica de la glucosa vía glucólisis, reacción del complejo de la piruvato deshidrogenasa, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa

Reacción	Número de ATP o coenzima reducido formado directamente	Número de ATP finalmente formado[a]
Glucosa → glucosa 6-fosfato	–1 ATP	–1
Fructosa 6-fosfato → fructosa 1,6-bisfosfato	–1 ATP	–1
2 Gliceraldehído 3-fosfato → 2 1,3-bisfosfoglicerato	2 NADH	3 or 5[b]
2 1,3-Bisfosfoglicerato → 2 3-fosfoglicerato	2 ATP	2
2 Fosfoenolpiruvato → 2 piruvato	2 ATP	2
2 Piruvato → 2 acetil-CoA	2 NADH	5
2 Isocitrato → 2 α-cetoglutarato	2 NADH	5
2 α-Cetoglutarato → 2 succinil-CoA	2 NADH	5
2 Succinil-CoA → 2 succinato	2 ATP (o 2 GTP)	2
2 Succinato → 2 fumarato	2 $FADH_2$	3
2 Malato → 2 oxalacetato	2 NADH	5
Total		30–32

[a]Se calcula la obtención de 2,5 ATP por NADH y 1,5 ATP por FADH2. Un valor negativo indica consumo.

[b]Este número es 3 ó 5 según el mecanismo utilizado para lanzar equivalentes de NADH desde el citosol a la matriz mitocondrial; véase las Figuras 19-30 y 19-31.

ácido cítrico, y se transfieren los electrones al O_2 vía fosforilación oxidativa, se obtienen hasta 32 ATP por glucosa (Tabla 16-1). En números redondos, esto representa la conservación de 32 x 30,5 kJ/mol = 976 kJ/mol o el 34% del máximo teórico de 2.840 kJ/mol disponibles de la oxidación completa de la glucosa . Estos cálculos utilizan las variaciones de energía libre estándar; cuando se corrige por la energía libre real necesaria para sintetizar ATP dentro de las células (véase el Ejemplo práctico 13-2,), la eficiencia calculada para el proceso es cercana al 65%.

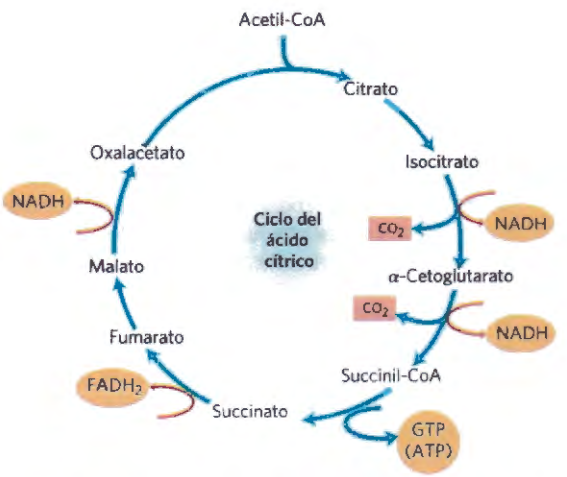


FIGURA 16-14 Productos de una vuelta del ciclo del ácido cítrico. En cada vuelta del ciclo se liberan tres móleculas de NADH, una de $FADH_2$, una de GTP (o ATP) y se eliminan dos CO_2 en reacciones de descarboxilación oxidativa. Aquí y en diversas figuras siguientes, todas las reacciones del ciclo se muestran como si se diesen sólo en una dirección, pero hay que recordar que la mayoría de reacciones son reversibles (véase la Fig. 16-7).

¿Por qué es tan complicada la oxidación del acetato?

El proceso cíclico de ocho pasos para la oxidación de grupos acetilo simples de dos átomos de carbono a CO_2 puede parecer innecesariamente complicado y no en consonancia con el principio biológico de máxima economía. Sin embargo, el papel del ciclo del ácido cítrico no está confinado a la oxidación del acetato. Esta vía metabólica constituye el centro del metabolismo intermediario. Productos finales de cuatro y cinco átomos de carbono procedentes de muchos procesos catabólicos alimentan el ciclo y sirven como combustibles. El oxalacetato y el α-cetoglutarato, por ejemplo, se producen a partir de aspartato y glutamato, respectivamente, durante la degradación de las proteínas. Bajo ciertas circunstancias metabólicas, los intermediarios son retirados del ciclo para ser utilizados como precursores en una multitud de vías biosintéticas.

El ciclo del ácido cítrico, como todas las otras vías metabólicas, es producto de la evolución, y gran parte de esta evolución tuvo lugar antes de la aparición de organismos aeróbicos. No representa necesariamente la vía *más corta* desde el acetato a CO_2, pero es la vía que, a través del tiempo, ha conferido las mayores ventajas selectivas. Los anaerobios primitivos utilizaron muy probablemente algunas de las reacciones del ciclo del ácido cítrico en procesos biosintéticos lineales. De hecho, algunos microorganismos aneróbicos modernos usan un ciclo del ácido cítrico incompleto como fuente, no de energía, sino de precursores biosintéticos **(Fig. 16-15)**. Estos organismos utilizan las tres primeras reacciones del ciclo para sintetizar α-cetoglutarato pero, al carecer de α-cetoglutarato deshidrogenasa, no pueden llevar a cabo el conjunto completo de reacciones del ciclo del ácido cítrico. Poseen los cuatro enzimas que catalizan la conversión reversible de oxalacetato en succinil-CoA, y pueden sintetizar malato, fumara-



FIGURA 16-15 Precursores biosintéticos producidos en un ciclo del ácido cítrico incompleto en bacterias anaeróbicas. Estos anaerobios carecen de α-cetoglutarato deshidrogenasa por lo que no pueden completar el ciclo del ácido cítrico. El α-cetoglutarato y el succinil-CoA sirven de precursores en una gran variedad de rutas biosintéticas. (Véase la Fig. 16-14 para la dirección "normal " de estas reacciones en el ciclo del ácido cítrico).

to, succinato y succinil-CoA a partir de oxalacetato en un sentido inverso a la dirección "normal" (oxidativa) de flujo a través ciclo. Esta ruta es una fermentación, con el NADH producido en la oxidación del isocitrato reciclado a NAD^+ mediante la reducción del oxalacetato a succinato.

Con la evolución de las cianobacterias que producían O_2 a partir de agua, la atmósfera de la tierra se transformó en aeróbica y los organismos estuvieron bajo una presión selectiva para desarrollar un metabolismo aeróbico que, como hemos visto, es mucho más eficiente que la fermentación anaeróbica.

Los componentes del ciclo del ácido cítrico son importantes intermediarios biosintéticos

En organismos aeróbicos, el ciclo del ácido cítrico es una **ruta anfibólica**, es decir que sirve tanto para procesos anabólicos como catabólicos. Aparte de su papel en el catabolismo oxidativo de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos, el ciclo proporciona precursores para muchas vías biosintéticas **(Fig. 16-16)**, a través de reacciones que cumplían el mismo propósito en nuestros antepasados anaeróbicos. El α-cetoglutarato y el oxalacetato pueden, por ejemplo, servir como precursores de los aminoácidos aspartato y glutamato por simple transaminación (Capítulo 22). A través del aspartato y glutamato, los átomos de carbono del oxalacetato y del α-cetoglutarato se utilizan entonces para sintetizar otros aminoácidos así como nucleótidos de purina y pirimidina. El succinil-CoA es un intermediario central en la síntesis del anillo de porfirina de los grupos hemo, que actúan como transportadores de oxígeno (en la hemoglobina y mioglobina) y de transportadores de electrones (en los citocromos) (véase la Fig. 22-25). El oxalacetato se convierte en glucosa mediante la gluconeogénesis (véase la Fig 15-13).

Dado que los átomos de carbono de las moléculas de acetato que entran en el ciclo del ácido cítrico aparecen ocho pasos más adelante en el oxalacetato, podría parecer que el ciclo podría generar oxalacetato a partir del acetato y, a continuación, se podría utilizar el oxalacetato para sintetizar glucosa. Sin embargo, la estequiometría del ciclo del ácido cítrico muestra que no hay conversión neta de acetato en oxalacetato; por cada dos carbonos que entran en el ciclo en forma de acetil-CoA, dos lo dejan en forma de CO_2. En muchos organismos no vertebrados, y en todas las plantas vasculares, otra secuencia de reacciones, el **ciclo del glioxilato**, actúa como mecanismo para convertir acetato en glúcido. El ciclo del glioxilato convierte *dos* moléculas de acetato en una de oxalacetato mediante una variante del ciclo del ácido cítrico en la que eluden los dos pasos de descarboxilación (véase la Fig. 20-55). Así. las plantas y muchos organismos sencillos pueden sintetizar glucosa a partir de ácidos grasos, cosa que no pueden hacer los vertebrados.

Las reacciones anaplerótica reponen los intermediarios del ciclo del ácido cítrico

A medida que los intermediarios del ciclo del ácido cítrico son retirados para servir como precursores biosintéticos, son repuestos mediante **reacciones anaplerótica** (Fig. 16-16; Tabla 16-2). En circunstancias normales, las reacciones por las que intermediarios del ciclo se dirigen hacia otras vías y aquéllas que permiten reponerlos se encuentran en equilibrio dinámico. Así pues, las concentraciones de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico permanecen prácticamente constantes.

La tabla 16-2 muestra las reacciones anapleróticas más comunes; todas ellas convierten piruvato o fosfoenolpiruvato en oxalacetato o malato en diversos tejidos y organismos. La reacción anaplerótica más importante en hígado y riñon de mamíferos es la carboxilación reversible del piruvato por el CO_2 para formar oxalacetato, catalizada por la **piruvato carboxilasa**. Cuando el ciclo del ácido cítrico carece de oxalacetato o de algún otro intermediario, se carboxila piruvato para producir más oxalacetato. La adición enzimática de un grupo carboxilo al piruvato requiere energía, que es aportada por el ATP; la energía libre necesaria para adicionar un grupo carboxilo al piruvato es aproximadamente igual a la energía libre disponible en el ATP.

La piruvato carboxilasa es un enzima regulador y se encuentra prácticamente inactivo en ausencia de acetil-CoA, su modulador alostérico positivo. Siempre que el acetil-CoA, el combustible del ciclo del ácido cítrico, está presente en exceso, se estimula la reacción de la piruvato carboxilasa para producir más oxalacetato, lo que permite que el ciclo utilice más acetil-CoA en la reacción de la citrato sintasa.

Las otras reacciones anapleróticas mostradas en la Tabla 16-2 están también reguladas para mantener el nivel de intermediarios suficientemente elevado como para sostener la actividad del ciclo del ácido cítrico. La fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, por ejeruplo, es activada por el intermediario glucolítico fructosa 1,6-bisfosfato, que se acumula cuando el ciclo del ácido cítrico

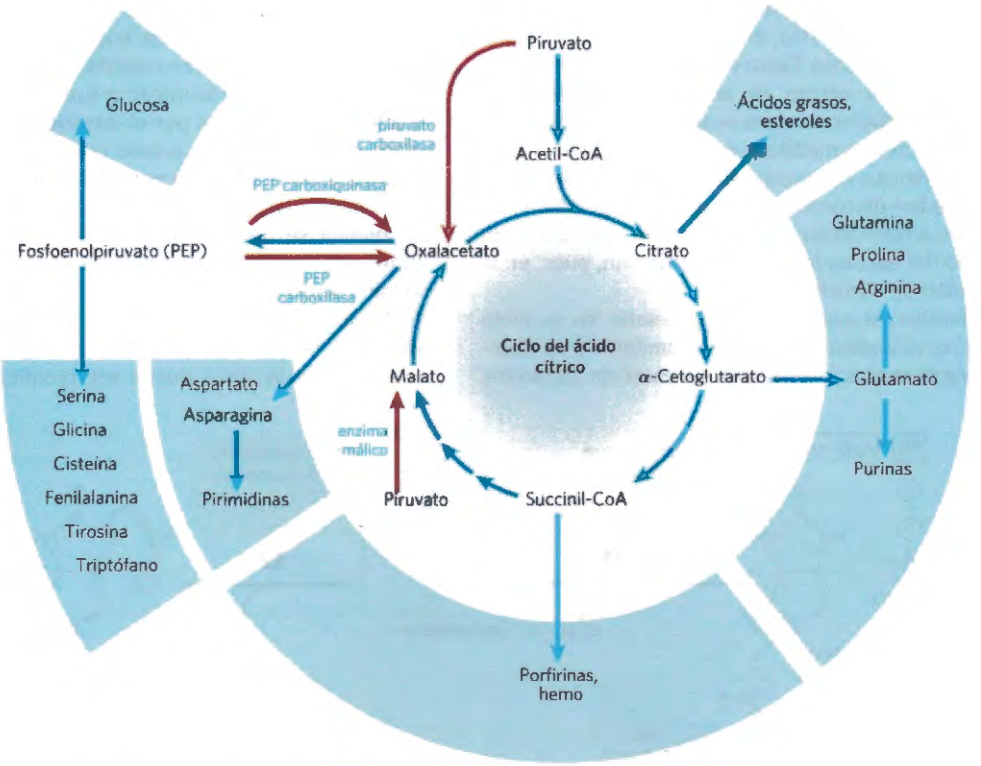


FIGURA 16-16 Papel del ciclo del ácido cítrico en el anabolismo. Se extraen intermediarios del ciclo del ácido cítrico como precursores en muchas rutas biosintéticas. En rojo se muestran cuatro reacciones anapleróticas que rellenan los los intermediarios del ciclo que se han agotado (véase la Tabla 16-2)

COPY-STATION

opera demasiado lentamente para poder procesar el piruvato generado en la glucólisis.

La biotina de la piruvato carboxilasa transporta grupos CO_2

La reacción de la piruvato carboxilasa requiere la presencia de la vitamina **biotina (Fig. 16-17)**, que actúa como grupo prostético del enzima. La biotina juega un papel clave en muchas reacciones de carboxilación. Es un transportador especializado de grupos monocarbonados en su forma más oxidada: CO_2. (La transferencia de grupos monocarbonados en formas más reducidas la llevan a cabo otros cofactores, especialmente el tetrahidrofolato y la *S*-adenosilmetionina, tal como se describe en el Capítulo 18.) Los grupos carboxilo son activados en una reacción que consume ATP y une CO_2 a la biotina ligada al enzima. Este CO_2 "activado" se transfiere entonces a un aceptor (piruvato en este caso) en una reacción de carboxilación.

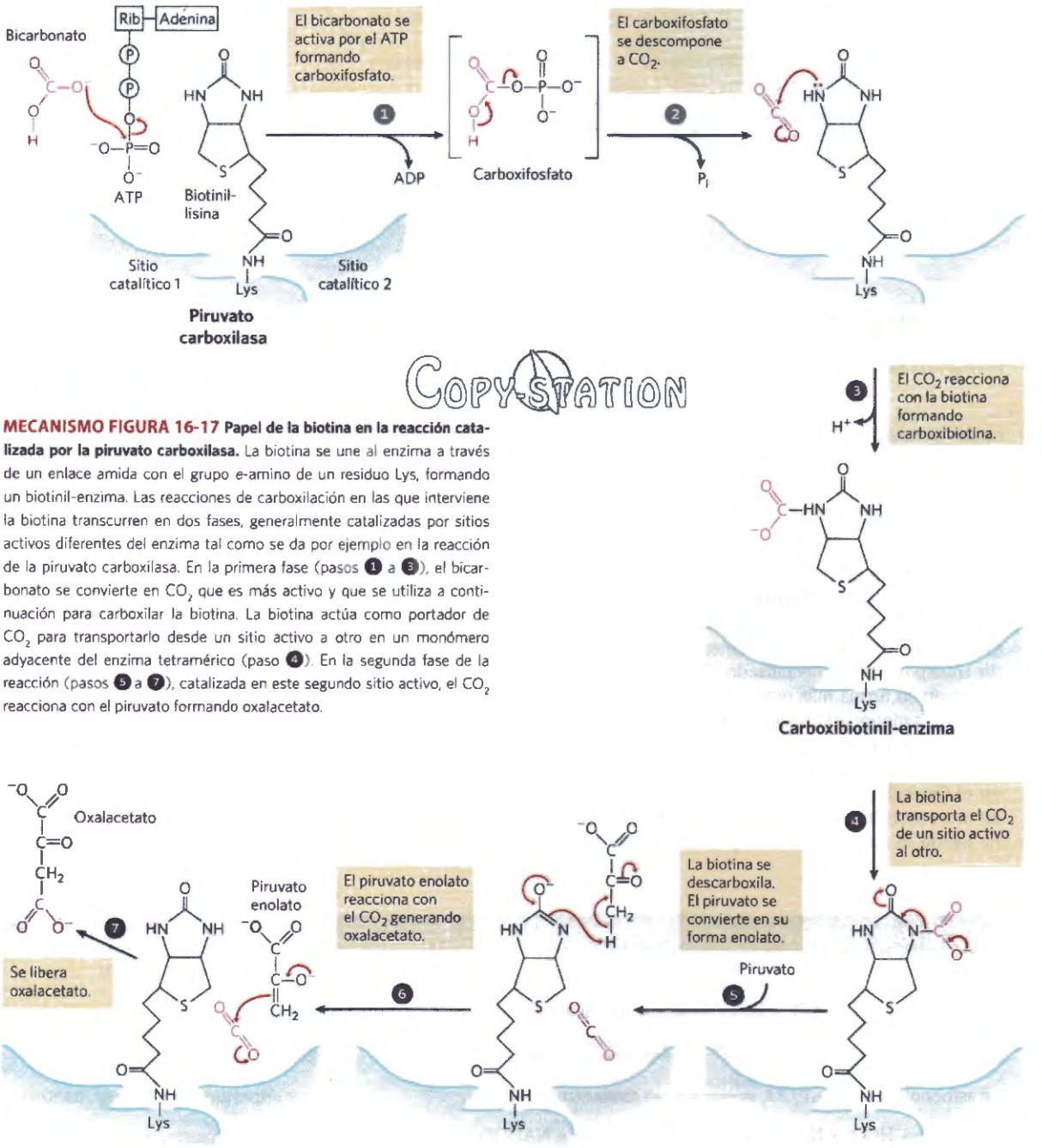
La piruvato carboxilasa se compone de cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene una molécula de biotina unida covalentemente a través de un enlace amida al grupo ε-amino de un residuo Lys específico en el sitio activo del enzima. La carboxilación del piruvato tiene lugar en dos pasos (Fig. 16-17): primero, un grupo carboxilo procedente del HCO_3^- se une a la biotina y a continuación el grupo carboxilo se transfiere al piruvato para formar oxalacetato. Estos dos pasos tienen lugar en sitios activos diferentes; el brazo largo y flexible de la biotina transfiere grupos carboxilo activados desde el primer sitio activo (en un monómero del tetrámero) al segundo (en el monòmero adyacente), actuando de un modo muy similar al del largo brazo lipoil-lisina de E_2 en el complejo de la PDH (Fig. 16-6) y al largo brazo de la porción tipo CoA de la proteína por-

TABLA 16-2 Reacciones anapleróticas

Reacción	Tejido(s)/organismo(s)
$\text{Piruvato} + HCO_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{piruvato carboxilasa}} \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i$	Hígado, riñón
$\text{Fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxiquinasa}} \text{oxalacetato} + \text{GTP}$	Corazón, músculo esquelético
$\text{Fosfoenolpiruvato} + HCO_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxilasa}} \text{oxalacetato} + P_i$	Plantas superiores, levaduras, bacterias
$\text{Piruvato} + HCO_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{enzima málico}} \text{malato} + \text{NAD(P)}^+$	Ampliamente distribuido en eucariotas y bacterias

tadora de acilos que interviene en la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21-5); en la **Figura 16-18** se comparan estos tres brazos Tanto el lipoato como la biotina y el pantotenato entran en las células mediante el mismo transportador; los tres se unen de manera covalente a las proteínas mediante reacciones similares y los tres proporcionan un anclaje flexible que permite que los intermedios de reacción unidos se transporten de un sitio activo a otro dentro de un complejo enzimático sin disociarse del mismo; todos ellos participan, pues, en la canalización de sustratos.

La biotina es una vitamina necesaria en la dieta humana; es abundante en muchos alimentos y es sintetizada por bacterias intestinales. La carencia de biotina es rara, pero puede aparecer a veces cuando se consumen grandes cantidades de huevos crudos. La clara de huevo contiene una gran cantidad de la proteína **avidina** (M_r 70.000), que se une muy fuertemente a la biotina e impide su absorción por el intestino. La avidina de la clara de huevo puede actuar como un mecanismo de defensa para el embrión potencial de pollo al inhibir el crecimiento bacteriano. Cuando se hierven los huevos, la avidina se desnaturaliza (y por tanto se inactiva) junto con el resto de proteínas de la clara de huevo. La avidina purificada es un reactivo útil en bioquímica y en biología celular. Una proteína que contenga biotina unida de forma covalente (obtenida experimentalmente o producida in vivo) puede ser recuperada mediante



MECANISMO FIGURA 16-17 Papel de la biotina en la reacción catalizada por la piruvato carboxilasa. La biotina se une al enzima a través de un enlace amida con el grupo ε-amino de un residuo Lys, formando un biotinil-enzima. Las reacciones de carboxilación en las que interviene la biotina transcurren en dos fases, generalmente catalizadas por sitios activos diferentes del enzima tal como se da por ejemplo en la reacción de la piruvato carboxilasa. En la primera fase (pasos ❶ a ❸), el bicarbonato se convierte en CO_2 que es más activo y que se utiliza a continuación para carboxilar la biotina. La biotina actúa como portador de CO_2 para transportarlo desde un sitio activo a otro en un monómero adyacente del enzima tetramérico (paso ❹). En la segunda fase de la reacción (pasos ❺ a ❼), catalizada en este segundo sitio activo, el CO_2 reacciona con el piruvato formando oxalacetato.

cromatografía de afinidad (véase la Fig. 3-17c) debido a la fuerte afinidad entre la biotina y la avidina. A continuación se eluye la proteína de la columna con un exceso de biotina libre. La elevadísima afinidad de la biotina por la avidina también se utiliza en el laboratorio en forma de adhesivo o pega molecular que puede mantener juntas dos estructuras (véase la Fig. 19-27).

RESUMEN 16.2 Reacciones del ciclo del ácido cítrico

- El ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo TCA) es una ruta catabólica central casi universal en la que compuestos producidos en la degradación de glúcidos, grasas y proteínas se oxidan a CO_2 y en el que la mayor parte de la energía de oxidación se conserva temporalmente en los transportadores electrónicos $FADH_2$ y NADH. Durante el metabolismo aeróbico estos electrones se transfieren al O_2 mientras que la energía del flujo electrónico se retiene en forma de ATP.
- El acetil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico (en las mitocondrias de eucariotas y en el citosol de bacterias) cuando la citrato sintasa cataliza su condensación con oxalacetato para formar citrato.
- En siete reacciones secuenciales, entre las que se incluyen dos descarboxilaciones, el ciclo del ácido cítrico convierte el citrato en oxalacetato y libera dos CO_2. La ruta es cíclica ya que no se utilizan los intermediarios del ciclo; se produce un oxalacetato por cada uno consumido.
- Por cada acetil-CoA oxidado por el ciclo del ácido cítrico, la ganancia energética consiste en tres moléculas de NADH, una de $FADH_2$ y un nucleósido trifosfato (ATP o GTP).
- Además del acetil-CoA cualquier compuesto que produzca un intermediario del ciclo de cuatro o cinco carbonos, por ejemplo los productos de degradación de muchos aminoácidos, puede ser oxidado por el ciclo.
- El ciclo del ácido cítrico es anfibólico ya que sirve tanto para el catabolismo como para el anabolismo; se pueden extraer intermediarios del ciclo y utilizarlos como material de partida para un buen número de productos biosintéticos.
- Los intermediarios desviados del ciclo del ácido cítrico hacia otras rutas, se reponen mediante varias reacciones anapleróticas, que producen intermediarios de cuatro carbonos por carboxilación de compuestos de tres carbonos; estas reacciones son catalizadas por la piruvato carboxilasa, PEP carboxiquinasa, PEP carboxilasa y el enzima málico.
- Los enzimas que catalizan carboxilaciones emplean normalmente biotina para activar el CO_2 y transportarlo a aceptores tales como el piruvato o el fosfoenolpiruvato.

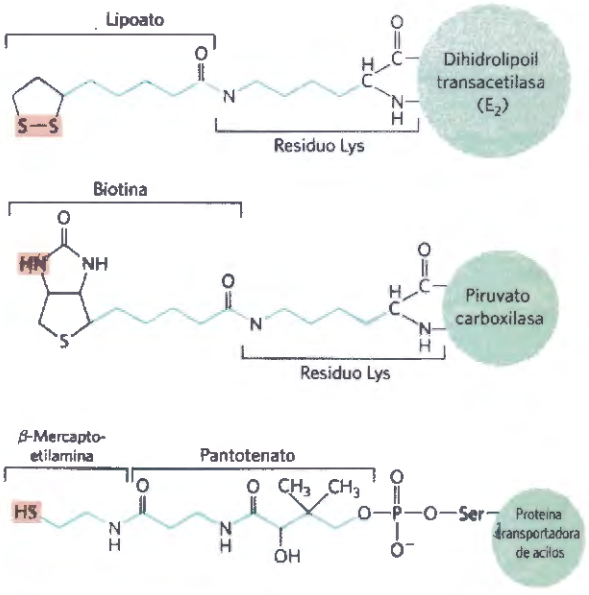


FIGURA 16-18 Ligadura biológicas. Los cofactores lipoato, biotina y la combinación de β-mercaptoetilamina y pantotenato forman brazos largos y flexibles (azul) en los enzimas a los que están unidos de forma covalente, actuando como ligaduras que transportan intermedios de un sitio activo al siguiente. El grupo sombreado en rosa es, en cada caso, el punto de unión del intermedio activo a la ligadura.

16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico

Tal como se ha visto en el Capítulo 15 la regulación de enzimas clave de las vías metabólicas por efectores alostéricos y mediante modificación covalente, asegura la producción de intermediarios a la velocidad requerida para mantener la célula en un estado estacionario estable y evita la innecesaria sobreproducción de los mismos. El flujo de átomos de carbono desde el piruvato hacia el ciclo del ácido cítrico y a través de él está sujeto a una estrecha regulación en, al menos, tres niveles: el transporte del piruvato a la mitocondria por el transportador mitocondrial de piruvato (MPC); la conversión del piruvato en acetil-CoA, el material de partida del ciclo (la reacción del complejo de la piruvato deshidrogenasa), y la entrada de acetil-CoA en el ciclo (la reacción de la citrato sintasa). El acetil-CoA también se produce por vías diferentes a las del complejo de la PDH (la mayor parte de células producen también acetil-CoA por oxidación de ácidos grasos y de ciertos aminoácidos), por lo que la disponibilidad de intermediarios de estas otras vías es también importante en la regulación de la oxidación del piruvato y del ciclo del ácido cítrico. El ciclo está también regulado a nivel de las reacciones de la isocitrato deshidrogenasa y de la α-cetoglutarato deshidrogenasa.

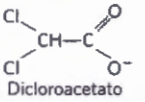
La producción de acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa está regulada por mecanismos alostéricos y covalentes

El complejo de la PDH de mamíferos es fuertemente inhibido por el ATP, así como por el acetil-CoA y el NADH, los productos de la reacción catalizada por el complejo **(Fig. 16-19)**. La inhibición alostérica de la oxidación del piruvato se incrementa enormemente cuando se hallan disponibles ácidos grasos de cadena larga. AMP, CoA y NAD^+, todos los cuales se acumulan cuando fluye demasiado poco acetato hacia el ciclo del ácido cítrico, activan alostéricamente el complejo de la PDH. Así, esta actividad enzimática es anulada cuando se dispone de una gran cantidad de combustible en forma de ácidos grasos y de acetil-CoA y cuando las

razones [ATP]/[ADP] y [NADH]/[NAD⁺] de la célula son elevadas, y es activada cuando las demandas energéticas son grandes y las células necesitan un flujo mayor de acetil-CoA hacia el ciclo.

En mamíferos, estos mecanismos de regulación alostérica se complementan con un segundo nivel de regulación: la modificación covalente de proteínas. El complejo de la PDH es inhibido mediante la fosforilación reversible de un residuo Ser específico en una de las dos subunidades de E_1. Tal como se ha mencionado con anterioridad, además de los enzimas E_1, E_2 y E_3, el complejo de la PDH de mamíferos contiene dos proteínas reguladoras, cuyo única función es regular la actividad del complejo. La piruvato deshidrogenasa quinasa fosforila y de este modo inactiva E_1, y una fosfoproteína fosfatasa específica elimina el grupo fosforilo por hidrólisis y así activa E_1. La quinasa es activada alostéricamente por ATP: cuando la [ATP] es elevada (lo que es reflejo de un suministro de energía suficiente), el complejo de la PDH es inactivado por fosforilación de E_1. Cuando la [ATP] desciende, la actividad de la quinasa disminuye y la acción de la fosfatasa elimina los grupos fosforilo de E_1 activando el complejo.

El compuesto sencillo dicloroacetato inhibe la piruvato deshidrogenasa quinasa en el laboratorio y, de este modo, elimina la inhibición del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Esto estimula la oxidación del piruvato a través del ciclo del ácido cítrico por lo que puede ser útil para dirigir el metabolismo de las células tumorales-lejos de la glucólisis aeróbica.



Dicloroacetato

Copy-station

El ciclo del ácido cítrico está regulado en sus tres pasos exergónicos

El flujo de metabolitos a través del ciclo del ácido cítrico está sometido a una regulación estricta. Tres factores gobiernan la velocidad de flujo a través del ciclo: la disponibilidad de sustratos, la inhibición por los productos acumulados y la retroinhibición alostérica de los enzimas que catalizan etapas tempranas del ciclo.

Cada una de las tres etapas altamente exergónicas en el ciclo, las catalizadas por la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa (Fig. 16-19), puede llegar a ser la etapa limitante de la velocidad en determinadas circunstancias. La disponibilidad de los sustratos de la citrato sintasa (acetil-CoA y oxalacetato) varía con el estado metabólico de la célula y limita en ocasiones la velocidad de formación de citrato. El NADH, un producto de la oxidación del isocitrato y el α-cetoglutarato, se acumula en ciertas condiciones, y a elevada [NADH]/[NAD⁺] ambas reacciones de deshidrogenación resultan severamente inhibidas por la acción de masas. De modo similar, en la célula, la reacción de la malato deshidrogenasa está esencialmente en equilibrio (es decir, está limitada por el sustrato), y cuando [NADH]/[NAD⁺] es alta, la concentración de oxalacetato es baja, lo que hace más lento el primer paso del ciclo. La acumulación de productos inhibe los tres pasos limitantes del ciclo: el succinil-CoA inhibe la α-cetoglutarato deshidrogenasa (y también la citrato sintasa); el citrato bloquea la citrato sintasa; y el producto final, ATP, inhibe tanto la citrato sintasa como la isocitrato deshidrogenasa . La inhibición de la citrato sintasa por el ATP es mitigada por el ADP, un activador alostérico de este enzima. En el músculo de vertebrados, el Ca^{2+}, la señal para la contracción y para el aumento concomitante en la demanda de ATP, activa tanto la isocitrato deshidrogenasa como la α-cetoglutarato deshidrogenasa, así como al complejo de la PDH. En resumen, las concentraciones de sustratos e intermediarios del ciclo del

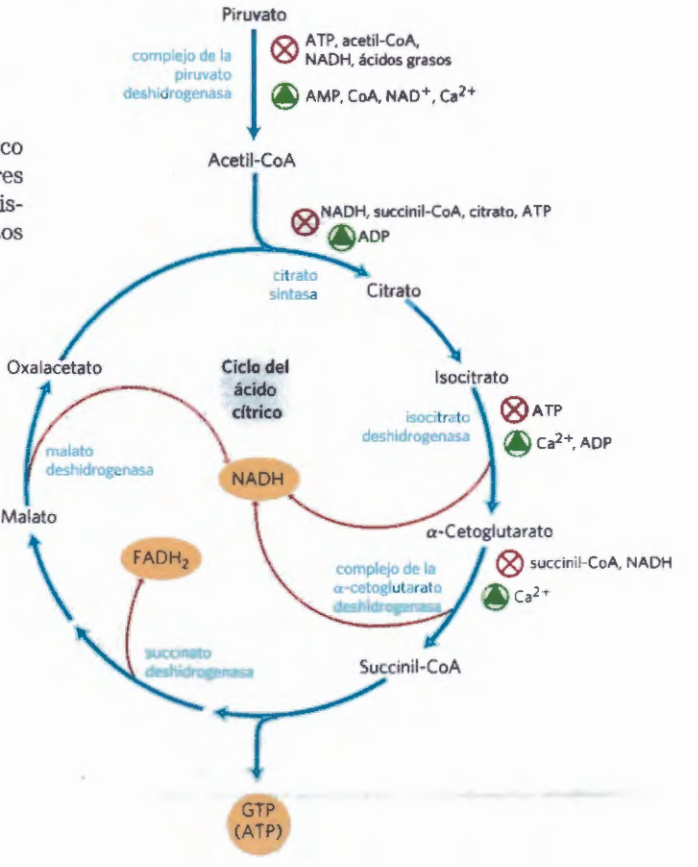
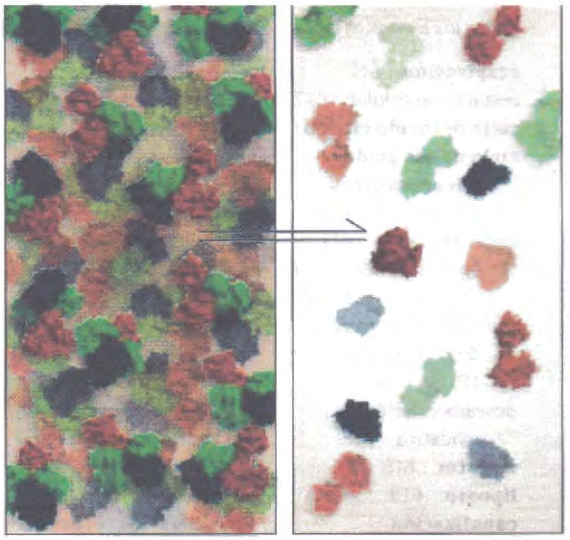


FIGURA 16-19 Regulación del flujo de metabolitos desde el complejo de la PDH a través del ciclo del ácido cítrico en mamíferos. El complejo de la PDH es inhibido alostéricamente cuando las relaciones [ATP]/[ADP], [NADH]/[NAD⁺] y [acetil-CoA]/[CoA] son altas, indicando todas ellas un estado metabólico energéticamente suficiente. Cuando estas relaciones disminuyen se produce una activación alostérica de la oxidación del piruvato. La velocidad de flujo a través del ciclo del ácido cítrico puede ser limitada por la disponibilidad de los sustratos de la citrato sintasa, oxalacetato y acetil-CoA, o de NAD^+ que desaparece por su conversión en NADH, con lo que se reduce la velocidad de los tres pasos de oxidación dependientes de NAD. El ciclo también es más lento como consecuencia de la retroinhibición por el succinil-CoA, el citrato y el ATP, que inhiben los primeros pasos. En tejido muscular, el ión Ca^{2+} es un indicador de la contracción y, tal como se muestra aquí, estimula el metabolismo productor de energía para reemplazar el ATP consumido en la contracción.



En el citosol las elevadas concentraciones de los enzimas 1, 2 y 3 favorecen su asociación.

En el extracto de células rotas, la dilución por el tampón reduce las concentraciones de los enzimas 1, 2 y 3 lo que favorece su disociación.

FIGURA 16-20 La dilución de una solución que contiene un complejo proteico no covalente –como por ejemplo uno que contiene tres enzimas (ilustrados aquí en rojo, azul y verde)– favorece la disociación del complejo en sus elementos constituyentes.

ácido cítrico hacen que el flujo a través de esta vía se mantenga a una velocidad que permite mantener concentraciones óptimas de ATP y NADH.

En condiciones normales, la velocidad de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico estan integradas de manera que sólo se metaboliza a piruvato la glucosa necesaria para suministrar al ciclo del ácido cítrico su combustible, los grupos acetilo del acetil-CoA. Piruvato, lactato y acetil-CoA se mantienen normalmente a concentraciones de estado estacionario. La velocidad de la glucólisis está adaptada a la del ciclo del ácido cítrico no sólo a través de su inhibición por niveles elevados de ATP y NADH, componentes comunes de las etapas glucolítica y respiratoria de la oxidación de la glucosa, sino también por la concentración de citrato. El citrato, producto del primer paso del ciclo del ácido cítrico, es un inhibidor alostérico importante de la fosfofructoquinasa-1 en la vía glucolítica (véase la Fig. 15-16).

En el ciclo del ácido cítrico puede darse la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos

Aunque normalmente se describen los enzimas del ciclo del ácido cítrico como componentes solubles de la matriz mitocondrial (excepto la succinato deshidrogenasa que está ligada a la membrana), cada vez hay más pruebas de que dentro de la mitocondria estos enzimas existen en forma de complejos multienzimáticos. La aproximación clásica de la enzimología, purificación de proteínas individuales a partir de extractos de células rotas, se aplicó con gran éxito a los enzimas del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, la primera víctima de la rotura celular es la organización de nivel superior dentro de proteína con otra, o de un enzima con algún componente estructural tal como una membrana, un microtúbulo o un microfilamento. Cuando se abren las células por rotura, sus contenidos, enzimas incluidos, se diluyen de 100 a 1.000 veces **(Fig. 16-20)**.

Varios tipos de pruebas sugieren que, en las células, los complejos multienzimáticos aseguran el paso eficiente del producto de una reacción enzimática al siguiente enzima de la ruta. Tales complejos se denominan **metabolones.** Se han aislado de forma conjunta varios enzimas del ciclo del ácido cítrico en forma de agregados supramoleculares o bien se han encontrado asociados con la membrana mitocondrial interna o se ha demostrado que difunden en la matriz mitocondrial más lentamente de lo que cabría esperar de la proteína individual en solución. Existen pruebas convincentes de la canalización de sustratos a través de complejos multienzimáticos en otras rutas metabólicas y muchos enzimas que se creía que eran "solubles" probablemente funcionan en la célula en forma de complejos altamente organizados que canalizan los intermedios. Encontraremos otros ejemplos de canalización cuando veamos la biosíntesis de aminoácidos y de nucleótidos en el Capítulo 22.

Algunas mutaciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico producen cáncer

Cuando los mecanismos que regulan una vía tal como el ciclo del ácido cítrico son superados por una perturbación metabólica importante, el resultado puede ser una enfermedad grave. Las mutaciones en enzimas del ciclo del ácido cítrico son muy raras en los humanos y otros mamíferos, pero las que tienen lugar

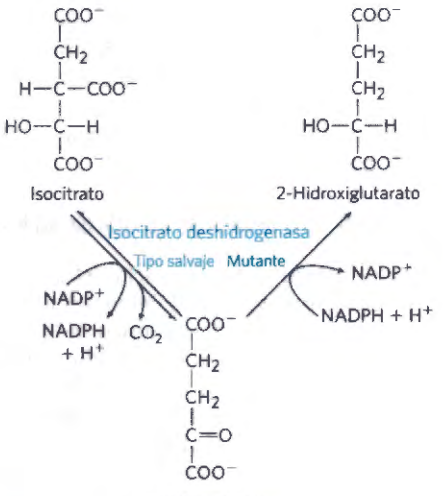


FIGURA 16-21 Una isocitrato deshidrogenasa mutante adquiere una nueva actividad. La isocitrato deshidrogenasa de tipo salvaje cataliza la conversión del isocitrato en α-cetoglutarato, pero las mutaciones que alteran el sitio de unión del isocitrato producen la pérdida de la actividad enzimática normal al tiempo que se gana una nueva actividad: la conversión del α-cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato. La acumulación de este producto inhibe la histona desmetilasa lo que altera la regulación génica y provoca tumores de células gliales en el cerebro.

son devastadoras. Defectos genéticos en el gen de la fumarasa producen tumores del músculo liso (leiomas) y del riñón; mutaciones en la succinato deshidrogenasa producen tumores de la grándula suprarrenal (feocromocitomas). En células en cultivo con estas mutaciones, se acumulan el fumarato (en el caso de las mutaciones de la fumarasa) y, en menor grado, el succinato (en el caso de mutaciones de la succinato deshidrogenasa), acumulación que induce el factor de transcripción HIF-1α inducible por hipoxia (véase el Recuadro 14-1). El mecanismo de formación de tumores podría ser la producción de un estado pseudohipóxico. En las células con estas mutaciones, se produce una activación de genes normalmente regulados por HIF-1α. Estos efectos de las mutaciones en los genes de la fumarasa y la succinato deshidrogenasa los definen como genes supresores tumorales. Los metabolitos que se acumulan (fumarato y succinato) se denominan oncometabolitos debido a su capacidad de favorecer la proliferación de células tumorales.

Otra conexión notable entre intermediarios del ciclo del ácido cítrico y cáncer es el hallazgo de que en muchos tumores de células gliales (gliomas), la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADPH tiene un defecto genético raro. El enzima mutante pierde su actividad normal (la conversión de isocitrato en α-cetoglutarato) pero *adquiere* una nueva actividad: la conversión del α-cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato **(Fig. 16-21)**, que se acumula en las células tumorales. El α-cetoglutarato y el Fe^{3+} son cofactores esenciales de una familia de histona desmetilasas que alteran la expresión génica al eliminar grupos metilo de residuos Arg y Lys en las histonas que organizan el DNA nuclear. Al competir con el α-cetoglutarato en su unión a las histona desmetilasas, el 2-hidroxiglutarato inhibe su actividad. La inhibición de las histona desmetilasas interfiere con la regulación génica normal lo que conduce a un crecimiento sin restricción de la célula glial. La familia de más de 60 dioxigenasas que utilizan α-cetoglutarato y Fe^{3+} como cofactores también son inhibidas de forma competitiva por el 2-hidroxiglutarato. La inhibición de uno o más de estos enzimas podría interferir con la regulación normal de la división celular y producir, así, un tumor. ■

RESUMEN 16.3 Regulación del ciclo del ácido cítrico

■ La velocidad global del ciclo del ácido cítrico está controlada por la velocidad de conversión del piruvato en acetil-CoA y por el flujo a través de la citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa. Estos flujos vienen determinados principalmente por la concentración de sustratos y productos; los productos finales, ATP y NADH, son inhibidores mientras que los sustratos NAD^+ y ADP son estimuladores.

■ La producción de acetil-CoA para el ciclo del ácido cítrico por el complejo de la PDH es inhibido alostéricamente por los metabolitos que indican una suficiencia de energía metabólica (ATP, acetil-CoA, NADH y àcidos grasos) y es estimulada por metabolitos que indican un suministro reducido de energía (AMP, NAD^+, CoA).

■ Los complejos de enzimas consecutivos de una ruta permiten la canalización de sustratos a través de los mismos.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

respiración 617
respiración celular 617
ciclo del ácido cítrico 617
ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) 617
ciclo de Krebs 617
transportador mitocondrial de piruvato (MPC) 618
complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) 618
descarboxilación oxidativa 618
tioéster 619
lipoato 619
canalización de sustratos 621
centro ferro-sulfurado 625
complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa 626
sintasas 629
sintetasas 629
ligasas 629
liasas 629
quinasas 629
fosforilasas 629
fosfatasas 629
nucleósido difosfato quinasa 630
molécula proquiral 632
ruta anfibólica 634
ciclo del glioxilato 634
reacción anaplerótica 634
biotina 635
avidina 636
metabolón 639

Problemas

1. Balance del ciclo del ácido cítrico El ciclo del ácido cítrico contiene ocho enzimas: citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa.

(a) Escriba una ecuación igualada para la reacción que catabliza cada enzima.

Nombre el cofactor o cofactores requeridos para cada reacción.

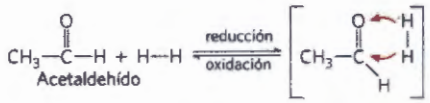
(c) Para cada enzima determine cuál de los siguientes describe el tipo de la reacción(es) que cataliza: condensación (formación de enlaces carbono-carbono); deshidratación (pérdida de agua); hidratación (adición de agua); descarboxilación (pérdida de CO_2); oxidación-reducción; fosforilación a nivel de sustrato; isomerización.

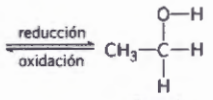
(d) Escriba una ecuación neta igualada para el catabolismo de acetil-CoA a CO_2.

2. Ecuación neta de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico Escriba la ecuación bioquímica neta para el metabolismo de una molécula de glucosa por la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, incluyendo todos los cofactores.

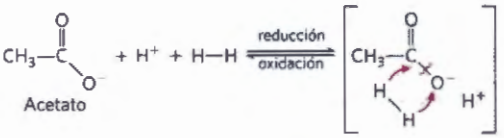
3. Identificación de reacciones de oxidación y de reducción Una estrategia bioquímica de muchos organismos vivos consiste en la oxidación secuencial de compuestos orgánicos a CO_2 y H_2O y en la conservación de la mayor parte de la energía así producida en forma de ATP. Es importante ser capaz de reconocer procesos de oxidación-reducción en el metabolismo. La reducción de una molécula orgánica se obtiene a partir de la hidrogenación de un doble enlace (Ecuación 1, abajo) o de un enlace sencillo acompañada por una ruptura molecular (Ecuación 2). Inversamente, la oxidación tiene lugar como consecuencia de una deshidrogenación. En las reacciones redox bioquímicas, los coenzimas NAD y FAD deshidrogenan o hidrogenan moléculas orgánicas en presencia de los enzimas correspondientes.

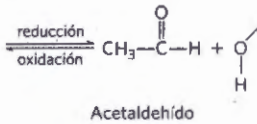
Copy-Station





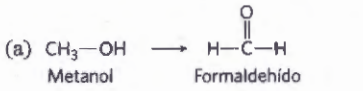
(a)

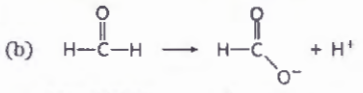


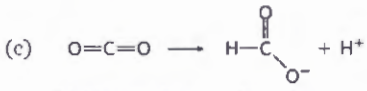


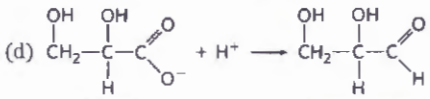
(b)

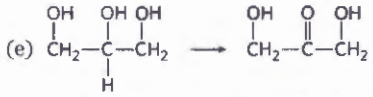
Para cada una de las transformaciones metabólicas que van desde (a) hasta (h), determine si se ha producido una oxidación o bien una reducción. Iguale cada transformación insertando H-H y, donde sea necesario, H_2O.

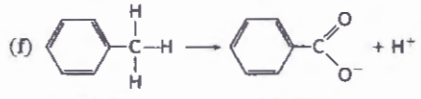


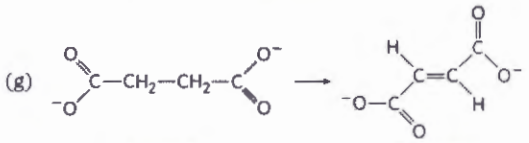


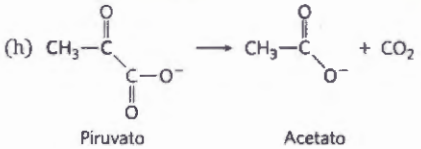










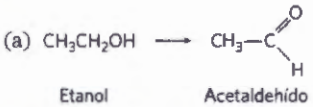


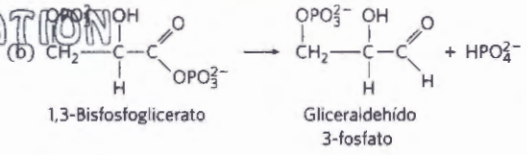
4. Relación entre energía liberada y estado de oxidación del carbono Una célula eucariótica puede utilizar glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y ácido hexanoico ($C_6H_{14}O_2$) como carburantes para la respiración celular. Basándose en sus fórmulas estructurales, qué sustrato liberará más energía por gramo después de una combustión completa a CO_2 y H_2O?

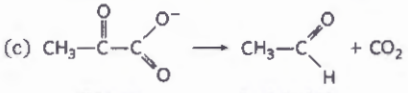
5. Coenzimas de nicotinamida como transportadores redox reversibles Los coenzimas de nicotinamida (véase la Fig. 13-24) pueden experimentar reacciones de oxidación-reducción reversibles con sustratos específicos en presencia de la deshidrogenasa apropiada. En estas reacciones, NADH + H^+ actúan como fuente de hidrógeno, tal como se describe en el problema 3. Siempre que el coenzima es oxidado, un sustrato debe ser simultáneamente reducido:

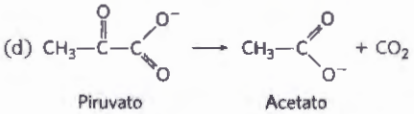
$$\underset{\text{Oxidized}}{\text{Substrate}} + \underset{\text{Reduced}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Reduced}}{\text{product}} + \underset{\text{Oxidized}}{\text{NAD}^-}$$

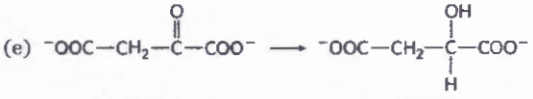
Para cada una de las reacciones desde (a) hasta (f), determine si el sustrato ha sido oxidado o reducido o si no ha habido cambio en su estado de oxidación (véase el Problema 3). Si ha ocurrido un cambio redox, iguale la reacción con la cantidad necesaria de NAD^+, NADH, H^+ y H_2O. El objetivo es reconocer cuando un coenzima redox es necesario en una reacción metabólica.

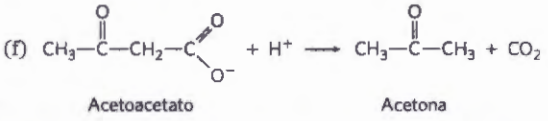












6. Cofactores y mecanismo de la piruvato deshidrogenasa Describa el papel de cada cofactor que interviene en la reacción catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa.

7. Carencia de tiamina Los individuos con carencia de tiamina en la dieta tienen concentraciones elevadas de piruvato en la sangre. Explique este hecho en términos bioquímicos.

COPY-STATION

8. Reacción de la isocitrato deshidrogenasa ¿Qué tipo de reacción química está implicado en la conversión del isocitrato en α-cetoglutarato? Nombre y describa el papel de los cofactores. ¿Qué otra reacción o reacciones del ciclo del ácido cítrico son del mismo tipo?

9. Estimulación del consumo de oxígeno por oxaloacetato y malato A principios de la década de 1930, Albert Szent-Györgyi expuso la interesante observación de que la adición de pequeñas cantidades de oxalacetato o de malato a suspensiones de músculo de pecho de paloma desmenuzado estimulaba el consumo de oxigeno de la preparación. Sorprendentemente, la cantidad de oxígeno consumida era unas siete veces mayor que la cantidad necesaria para la oxidación completa (a CO_2 y H_2O) del oxalacetato o malato añadido. ¿Por qué la adición de oxalacetato o malato estimulaba el consumo de oxígeno? ¿Por qué la cantidad de oxígeno consumida era mucho mayor que la cantidad necesaria para oxidar completamente el oxalacetato o el malato añadidos?

10. Formación de oxalacetato en la mitocondria En la última reacción del ciclo del ácido cítrico, el malato se deshidrogena para regenerar el oxalacetato necesario para la entrada del acetil-CoA en el ciclo:

$$\text{L-Malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \qquad \Delta G'^\circ = 30{,}0 \text{ kJ/mol}$$

(a) Calcule la constante de equilibrio para esta reacción a 25 °C.

(b) Debido a que $\Delta G'^\circ$ supone un pH estándar de 7, la constante de equilibrio calculada en (a) corresponde a

$$K'_{eq} = \frac{[\text{oxalacetato}][\text{NADH}]}{[\text{L-malato}][\text{NAD}^+]}$$

La concentración de L-malato medida en la mitocondria de hígado de rata es de unos 0,20 mM cuando $[NAD^+]/[NADH]$ es 10. Calcule la concentración de oxalacetato a pH 7 en estas mitocondrias.

(c) Para apreciar la magnitud de la concentración de oxalacetato mitocondrial, calcule el número de moléculas de oxalacetato existentes en una única mitocondria de hígado de rata. Suponga que la mitocondria es una esfera, con un diámetro de unos 2,0 μm.

11. Cofactores para el ciclo del ácido cítrico Suponga que ha preparado un extrato mitocondrial que contiene todos los enzimas solubles de la matriz pero que ha perdido (por diálisis) todos los cofatores de baja masa molecular. ¿Qué habrá de añadir al extracto de manera que la preparación pueda oxidar el acetil-CoA a CO_2?

12. Carencia de riboflavina ¿De qué modo podría afectar al funcionamiento del ciclo del ácido cítrico una carencia de riboflavina? Justifique su respuesta.

13. Reserva de oxalacetato ¿Qué factores podrían disminuir la reserva de oxalacetato disponible para la actividad del ciclo del ácido cítrico? ¿Cómo se puede reponer la reseva de oxalacetato?

14. Energía obtenida a partir del ciclo del ácido cítrico La reacción catalizada por la succinil-CoA sintetasa produce el compuesto de elevada energía GTP. ¿Cómo se incorpora la energía libre contenida en el GTP en el contenido celular de ATP?

15. Estudios de la respiración en mitocondrias aisladas La respiración celular se puede estudiar en mitocondrias aisladas midiendo el consumo de oxígeno en diferentes condiciones. Si se añade 0,01 M de malonato sódico a mitocondrias que respiran activamente y que utilizan piruvato como combustible, la respiración pronto se para y se acumula un intermediario metabólico.

(a) ¿Cuál es la estructura de este intermediario?

(b) Explique por qué se acumula.

(c) Explique por qué se para el consumo de oxígeno.

(d) Aparte de eliminar el malonato, ¿cómo se podría superar esta inhibición de la respiración? Explíquelo.

16. Estudios de marcaje en mitocondrias aisladas Las vías metabólicas de los compuestos orgánicos se han obtenido a menudo usando sustratos marcados radiactivamente y siguiendo el destino final de los átomos marcados.

¿Cómo podría determinar si la glucosa añadida a una suspensión de mitocondrias aisladas se metaboliza a CO_2 y H_2O? Suponga que añade un breve pulso de [3-^{14}C]piruvato (marcado en la posición metilo) a las mitocondrias. Después de una vuelta del ciclo del ácido cítrico, ¿cuál será la posición del ^{14}C en el oxalacetato? Explíquelo siguiendo el ^{14}C a través de la vía. ¿Cuántas vueltas del ciclo serán necesarias para liberar todo el [3-^{14}C]piruvato en forma de CO_2?

17. Ruta del CO_2 en la gluconeogénesis En el primer paso de rodeo de la gluconeogénesis, conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato (PEP), el piruvato se carboxila por la piruvato carboxilasa a oxalacetato, que a continuación se descarboxila a PEP por la PEP carboxiquinasa (Capítulo 14). Debido a que a la adición de CO_2 le sigue una pérdida de CO_2, podría esperarse que en experimentos de seguimiento, el ^{14}C del $^{14}CO_2$ no se incorporara ni al PEP, ni a la glucosa ni a cualquiera de los intermediarios de la gluconeogénesis. No obstante, se encontró que cuando una preparación de hígado de rata sintetiza glucosa en presencia de $^{14}CO_2$, aparece lentamente ^{14}C en el PEP y finalmente en C-3 y C-4 de la glucosa. ¿Cómo entra el ^{14}C en el PEP y en la glucosa? (Pista: Durante la gluconeogénesis en presencia de $^{14}CO_2$ también se marcan diversos intermediarios de cuatro carbonos del ciclo del ácido cítrico).

18. Catabolismo de [1-^{14}C]glucosa Un cultivo bacteriano que respira activamente se incuba brevemente con [1-^{14}C]glucosa, y se aislan los intermediarios glucolíticos y del ciclo del ácido cítrico. ¿Dónde se halla el ^{14}C en cada uno de los intermediarios indicados a continuación? Considere sólo la incorporación inicial de ^{14}C, en el primer paso de la glucosa marcada a través de las vías.

(a) Fructosa 1,6-bisfosfato

(b) Gliceraldehído 3-fosfato

(c) Fosfoenolpiruvato

(d) Acetil-CoA

(e) Citrato

(f) α-Cetoglutarato

(g) Oxalacetato



19 Papel de la vitamina tiamina Las personas que padecen beriberi, una enfermedad causada por la carencia de tiamina, presentan elevados niveles de piruvato y α-cetoglutarato en sangre, especialmente después de consumir una comida rica en glucosa. ¿Cómo se relacionan estos efectos con la deficiencia de tiamina?

Copy Station

20. Síntesis de oxalacetato por el ciclo del ácido cítrico El oxalacetato se forma en el último paso del ciclo del ácido cítrico por la oxidación de L-malato dependiente de NAD^+. ¿Puede tener lugar una síntesis neta de oxalacetato a partir de acetil-CoA utilizando únicamente los enzimas y cofactores del ciclo del ácido cítrico sin eliminar los intermediarios del ciclo? Explíquelo. ¿Cómo se recupera el oxalacetato perdido en el ciclo (dirigido hacia reacciones biosintéticas)?

21. Eliminación del oxalacetato El hígado de mamíferos puede llevar a cabo la gluconeogénesis utilizando oxalacetato como material de partida (Capítulo 14). ¿Quedaría afectado el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico si se utilizase profusamente el oxalacetato para la gluconeogénesis? Justifique su respuesta.

22. Modo de acción del rodenticida fluoroacetato El fluoroacetato, preparado comercialmente para el control de roedores es también producido por una planta en África del Sur. Después de entrar en la célula, el fluoroacetato se convierte en fluoroacetil-CoA en una reacción catalizada por el enzima acetato tioquinasa:

$$F{-}CH_2COO^- + CoA\text{-}SH + ATP \longrightarrow F{-}CH_2C(=O){-}S\text{-}CoA + AMP + PP_i$$

El efecto tóxico del fluoroacetato se estudió en un experimento utilizando corazón aislado de rata intacto. Después de la perfusión del corazón con fluoroacetato 0,22 mM, disminuyeron la tasa de captación de glucosa y la glucólisis al tiempo que se acumulaban la glucosa 6-fosfato y la fructosa 6-fosfato. Un examen de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico reveló que sus concentraciones se hallaban por debajo de lo normal, excepto para el citrato, con una concentración 10 veces superior a la normal.

(a) ¿Dónde tuvo lugar el bloqueo del ciclo del ácido cítrico? ¿Qué produjo la acumulación del citrato y la disminución de los otros intermediarios del ciclo?

(b) El fluoroacetil-CoA se transforma enzimáticamente en el ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál es la estructura del producto final del metabolismo del fluoroacetato? ¿Por qué bloquea el ciclo del ácido cítrico? ¿Cómo se podría superar esta inhibición?

(c) En los experimentos de perfusión del corazón, ¿por qué disminuyeron la captación de glucosa y la glucólisis? ¿Por qué se acumularon hexosas monofosfato?

(d) ¿Por qué el envenenamiento con fluoroacetato es letal?

23. Síntesis de L-malato en la producción de vino El sabor agrio de algunos vinos es debido a altas concentraciones de L-malato. Escriba una secuencia de reacciones en la que se muestre de qué modo las células de levadura sintetizan L-malato a partir de glucosa en condiciones anaeróbicas en presencia de CO_2 disuelto (HCO_3^-). Tenga en cuenta que la reacción global para esta fermentación no puede comportar el consumo de coenzimas de nicotinamida o intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

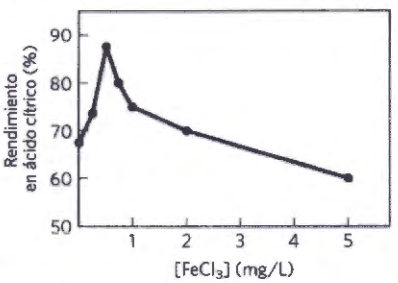
24. Síntesis neta de α-cetoglutarato El α-cetoglutarato desempeña un papel central en la biosíntesis de diversos aminoácidos. Escriba una secuencia de reacciones enzimáticas que pueda llevar a la síntesis neta de α-cetoglutarato a partir de piruvato. La secuencia propuesta no debe comportar el consumo neto de otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Escriba una ecuación para la reacción global e identifice la procedencia de cada reactivo.

25. Rutas anfibólicas Explique, dando ejemplos, qué se entiende al decir que el ciclo del ácido cítrico es anfibólico.

26. Regulación del complejo de la piruvato deshidrogenasa En tejidos animales, la velocidad de conversión del piruvato en acetil-CoA está regulada por la relación de complejo de la PDH fosforilada activa frente a la forma desfosforilada inactiva. Determine qué le ocurre a la velocidad de esta reacción cuando se trata una preparación de mitocondria de músculo de conejo que contiene el complejo de la PDH con: (a) piruvato deshidrogenasa quinasa, ATP y NADH; (b) piruvato deshidrogenasa fosfatasa y Ca^{+2}; (c) malonato.

27. Síntesis comercial de ácido cítrico El ácido cítrico se utiliza como agente aromatizante en refrescos, zumos de frutas y muchos otros tipos de alimentos. El mercado del ácido cítrico produce a nivel mundial centenares de millones de dólares al año. La producción comercial utiliza el hongo *Aspergillus niger*, que metaboliza la sacarosa en condiciones cuidadosamente controladas.

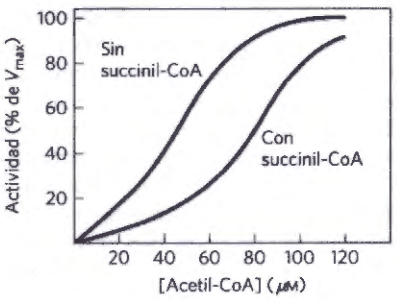
(a) El rendimiento de ácido cítrico depende fuertemente de la concentración de $FeCl_3$ en el medio de cultivo, tal como se indica en el gráfico. ¿Por qué baja el rendimiento cuando la concentración de Fe^{3+} está por debajo o por encima del valor óptimo de 0,5 mg/L?



(b) Escriba la secuencia de reacciones mediante las que *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir de sacarosa. Escriba una ecuación para la reacción global.

(c) ¿Es necesario para el proceso comercial que el cultivo esté aireado? Es decir, ¿se trata de una fermentación o de un proceso aeróbico? Explíquelo.

28. Regulación de la citrato sintasa En presencia de cantidades saturantes de oxalacetato, la actividad de la citrato sintasa de tejido de corazón de cerdo presenta una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de acetil-CoA, tal como se indica en la gráfica. Cuando se añade succinil-CoA, la curva experimenta un desplazamiento hacia la derecha y se acentúa la dependencia sigmoidea.



Basándose en estas observaciones, sugiera de qué modo

el succinil-CoA regula la actividad de la citrato sintasa. (Pista: véase la Fig. 6-35). ¿Por qué el succinil-CoA es una señal apropiada para la regulación del ciclo del ácido cítrico? ¿De qué modo la regulación de la citrato sintasa, controla la velocidad de respiración celular en el tejido de corazón de cerdo?

29. Regulación de la piruvato carboxilasa La carboxilación del piruvato por la piruvato carboxilasa tiene lugar a una velocidad muy baja a menos que esté presente el acetil-CoA, un modulador alostérico positivo. Si acaba de ingerir una comida rica en ácidos grasos (triacilgliceroles) pero baja en glúcidos (glucosa), ¿cómo detiene esta propiedad reguladora la oxidación de glucosa a CO_2 y H_2O pero incrementa la oxidación del acetil-CoA procedente de los ácidos grasos?

30. Relación entre respiración y ciclo del ácido cítrico Aunque el oxígeno no participa directamente en el ciclo del ácido cítrico, el ciclo opera únicamente cuando está presente O_2. ¿Por qué?

31. Efecto de [NADH]/[NAD⁺] sobre el ciclo del ácido cítrico ¿Cómo esperaría que respondiese el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico a un incremento rápido de la razón [NADH]/[NAD⁺] en la matriz mitocondrial? ¿Por qué?

32. Termodinámica de la reacción de la citrato sintasa en las células El citrato se forma por condensación de acetil-CoA con oxalacetato, catalizada por la citrato sintasa:

$$\text{Oxalacetato} + \text{acetil-CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{citrato} + \text{CoA} + H^+$$

En mitocondrias de corazón de rata a pH 7,0 y 25 °C, las concentraciones de reactivos y productos son: oxalacetato, 1 μm; acetil-CoA, 1 μm; citrato, 220 μm; y CoA, 65 μm. La variación de energía libre estándar para la reacción de la citrato sintasa es -32,2 kJ/mol. ¿Cuál es la dirección del flujo de metabolito a través de la reacción de la citrato sintasa en células de corazón de rata? Explíquelo.

33. Reacciones del complejo de la piruvato deshidrogenasa En dos de los pasos de la descarboxilación oxidativa del piruvato (pasos ❹ y ❺ en la Fig. 16-6) no interviene ninguno de los tres carbonos del piruvato a pesar de ser esenciales para la acción del complejo de la PDH. Explíquelo.

34. Mutantes del ciclo del ácido cítrico Existen muchos casos de enfermedades humanas en la que una u otra actividad enzimática está ausente debido a mutación genética. No obstante, son rarísimos los casos de individuos que carecen de uno de los enzimas del ciclo del ácido cítrico. ¿Por qué?

Problema de análisis de datos

35. ¿Cómo se descubrió el ciclo del ácido cítrico? Varios investigadores determinaron los detalles bioquímicos del ciclo del ácido cítrico durante varias décadas. En un artículo del año 1937 Krebs y Johnson resumieron su trabajo y el de otros en la primera descripción publicada de esta vía.

Los métodos usados por estos investigadores eran muy diferentes de los de la bioquímica moderna. Hasta la década de 1940 no había acceso a la utilización de marcadores radiactivos por lo que Krebs y otros investigadores tuvieron que utilizar técnicas no trazadoras para deducir la vía. Utilizando muestras frescas de músculo pectoral de pichón, determinaron el consumo de oxígeno provocado al suspender músculo triturado en tampón dentro de un matraz sellado, midiendo el volumen (en μL) de oxígeno consumido en diferentes condiciones. Midieron las concentraciones de sustratos (intermediarios) tratando las muestras con ácido para eliminar las proteínas contaminantes y determinaron a continuación las cantidades de diversas moléculas orgánicas pequeñas. Las dos observaciones clave que permitieron a Krebs y colaboradores proponer un *ciclo* del ácido cítrico, en contraposición a una *ruta lineal* se realizaron en los siguientes experimentos.

Experimento I. Incubaron 460 mg de músculo triturado en 3 mL de tampón a 40 °C durante 150 minutos. La adición de *citrato* aumentó el consumo de oxígeno en 893 μL en comparación con muestras a las que no había adicionado citrato. Calcularon, basándose en el O_2 consumido durante la respiración de otros compuetos carbonados, que el consumo de O_2 esperado para la respiración completa de esta cantidad de citrato era de sólo 302 μL.

Experimento II. Midieron el consumo de oxígeno provocado por 460 mg de músculo triturado en 3 mL de tampón cuando se incubaba con *citrato* y/o *1-fosfoglicerol* (glicerol 1-fosfato); compuesto que se sabía que era rápidamente oxidado por la respiración celular) a 40 °C durante 140 minutos. Los resultados se muestran en la tabla.

Muestra	Sustrato(s) añadido(s)	μL O_2 absorbido
1	No extra	342
2	0,3 mL de 1-fosfoglicerol 0,2 m	757
3	0,15 mL de citrato 0,02 m	431
4	0,3 mL de 1-fosfoglicerol 0,2 m y 0,15 mL de citrato 0,02 m	1.385

COPY STATION

(a) ¿Por qué el consumo de O_2 es una buena mediad de la respiración celular?

(b)¿Por qué la muestra 1 (tejido muscular sin suplementos) consume una cierta cantidad de oxígeno?

(c) Basándose en los resultados de las muestra 2 y 3, ¿puede concluir que el 1-fosfoglicerol y el citrato actúan como sustratos para la respiración celular en este sistema? Razónelo.

(d) Krebs y colaboradores utilizaron los resultados de estos experimentos para sugerir que el citrato era "catalítico", es decir que ayudaba a las muestras de tejido a metabolizar 1-fosfoglicerol de manera más completa. ¿Cómo utilizaría sus datos para apoyar su conclusión?

(e) Krebs y colaboradores argumentaron que el citrato no sólo era consumido por estas reacciones sino que había de ser *regenerado*. Por este motivo las reacciones habían de contituir un *ciclo* y no una vía lineal. ¿Cómo apoyaría esta deducción?

Otros investigadores habían encontrado que el *arsenato* (AsO_4^{3-}) inhibe la α-cetoglutarato deshidrogenasa y que el *malonato* inhibe la succinato deshidrogenasa.

(f) Krebs y colaboradores encontraron que las muestras de tejido muscular tratadas con arsenato y citrato consumían citrato únicamnte en presencia de oxígeno; y en estas condiciones, se consumía oxígeno. Basándose en la ruta de la Figura 16-7, ¿en qué se convertía el citrato en este experimento? y ¿por qué las muestras consumían oxígeno?

En su artículo Krebs y Johnson también aportaron lo siguiente. (1) En presencia de arsenato, 5,48 mmol de citrato se convirtieron en 5,07 mmol de α-cetoglutarato. (2) En presencia de malonato, el citrato se convertía de modo cuantitativo en grandes cantidades de succinato y pequeñas cantidades de α-cetoglutarato. (3) La adición de oxalacetato en ausencia de

oxígeno condujo a la producción de grandes cantiadades de citrato; la cantidad aumentaba si también se añadía glucosa.

Otros investigadores habían encontrado la siguiente ruta en preparaciones de tejido muscular similares:

Succinato ⟶ fumarato ⟶ malato ⟶ oxalacetato ⟶ piruvato

Basándose únicamente en los datos presentados en este problema, ¿cuál es el orden de los intermediarios del ciclo? ¿Concuerda ello con la Figura 16-7? Justifique su respuesta.

¿Por qué fue importante demostrar la conversión *cuantitativa* del citrato en α-cetoglutarato?

El artículo de Krebs y Johnson también contiene otros datos que rellenaban la mayoría de componentes que faltaban en el ciclo. El único componente que quedaba por identificar era la molécula que reaccionaba con el oxalacetato para formar citrato.

Referencia

Krebs, H.A., and W.A. Johnson. 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4:148–156. Reprinted in *FEBS Lett.* 117(Suppl.):K2–K10, 1980.

La **Bibliografía complementaria** se encuentra disponible en www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e.

CAPÍTULO 17

Catabolismo de los ácidos grasos

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas 648

17.2 Oxidación de los ácidos grasos 652

17.3 Cuerpos cetónicos 666

La oxidación de los ácidos grasos de cadena larga hasta acetil-CoA es una ruta central de producción de energía en muchos organismos y tejidos. En el corazón y en el hígado de mamíferos, por ejemplo, proporciona hasta el 80% de las necesidades energéticas en todas las circunstancias fisiológicas. Los electrones eliminados de los ácidos grasos durante la oxidación pasan a través de la cadena respiratoria impulsando la síntesis de ATP; el acetil-CoA formado a partir de los ácidos grasos puede oxidarse completamente a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, con lo que la conservación de energía es aún mayor. En algunas especies y en algunos tejidos, el acetil-CoA puede tener destinos alternativos. En el hígado, el acetil-CoA se puede convertir en cuerpos cetónicos, combustibles hidrosolubles que se exportan al cerebro y a otros tejidos cuando no hay glucosa disponible. En las plantas vasculares, el ácetil-CoA se utiliza preferentemente como precursor biosintético y sólo juega un papel secundario como combustible. A pesar de las diferencias existentes en la función biológica de la oxidación de ácidos grasos entre los diferentes organismos, el mecanismo es esencialmente el mismo. Este capítulo se centra principalmente en el proceso repetitivo de cuatro pasos denominado **β-oxidación**.

En el Capítulo 10 se describieron las propiedades de los triacilgliceroles (también denominados triglicéridos o grasas neutras) que son especialmente adecuados como combustibles de reserva. Las largas cadenas alquílicas de sus ácidos grasos constituyentes son esencialmente hidrocarburos, estructuras muy reducidas con una energía de oxidación completa (~38 kJ/g) que es más del doble de la correspondiente al mismo peso de proteína o de glúcido. Esta ventaja va acompañada de la extrema insolubilidad de los lípidos en agua; los triacilgliceroles celulares se agregan en gotículas de lípido, que no aumentan la osmolaridad del citosol, y no están solvatadas. (Por el contrario, en los polisacáridos de almacenamiento el agua de solvatación puede constituir las dos terceras partes del peso total de las moléculas almacenadas). Por otra parte, debido a su relativa inercia química, los triacilgliceroles se pueden almacenar en grandes cantidades en las células sin riesgo de que se produzcan reacciones químicas no deseadas con otros constituyentes celulares.

Sin embargo, las mismas propiedades que convierten a los triacilgliceroles en buenos compuestos de almacenamiento, hacen que presenten problemas en su papel como combustibles. Dada su insolubilidad en agua, los triacilgliceroles ingeridos deben ser emulsionados antes de poder ser digeridos a cargo de enzimas hidrosolubles en el intestino, y los triacilgliceroles absorbidos en el intestino, o movilizados desde los tejidos donde son almacenados, deben transportarse en la sangre unidos a proteínas que compensan su insolubilidad. Además, para superar la relativa estabilidad de los enlaces C-C de un ácido graso, el grupo carboxilo en C-1 es activado por la unión al coenzima A, lo que permite la oxidación por pasos del grupo acilo graso en la posición C-3 o β -de ahí el nombre β-oxidación-.

Empezaremos este capítulo con una breve discusión acerca de las fuentes de ácidos grasos y de las rutas de transporte al lugar donde se produce su oxidación, poniendo un énfasis especial en el proceso en los vertebrados. A continuación se describirán las etapas químicas de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias. Existen tres etapas en la oxidación completa de ácidos grasos a CO_2 y H_2O: la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga a fragmentos de dos átomos de carbono, en forma de acetil-CoA (β-oxidación); la oxidación del acetil-CoA a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16); y la transferencia de electrones desde los transportadores electrónicos reducidos a la cadena respiratoria mitocondrial (Capítulo 19). En este capítulo nos centraremos en la primera de estas etapas. Empezamos nuestra consideración sobre la β-oxidación con el caso sim-

ple por el que un ácido graso completamente saturado y con un número par de átomos de carbono es degradado a acetil-CoA. A continuación estudiaremos brevemente las transformaciones adicionales necesarias para la degradación de ácidos grasos insaturados o que posean un número impar de átomos de carbono. Finalmente, comentaremos las variaciones sobre el tema de la β-oxidación que se producen en orgánulos especializados -peroxisomas y glioxisomas- y dos rutas menos corrientes del catabolismo de los ácidos grasos: ω- y α-oxidación. El capítulo concluirá con una descripción de un destino alternativo seguido por el acetil-CoA formado en la β-oxidación en vertebrados: la producción de cuerpos cetónicos en el hígado.

17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas

Las células pueden obtener ácidos grasos combustibles a partir de cuatro fuentes: grasas consumidas en la dieta, grasas almacenadas en las células en forma de gotículas de lípidos, grasas sintetizadas en un órgano y que se exportan a otro y grasas obtenidas por autofagia (en la que se degradan los orgánulos de las propias células). Algunas especies utilizan las cuatro fuentes en diversas circunstancias, mientras que otras solamente utilizan una o dos. Los vertebrados, por ejemplo, obtienen grasas de la dieta, movilizan grasas almacenadas en tejidos especializados (tejido adiposo, constituido por células denominadas adipocitos) y, en el hígado, convierten en grasas los glúcidos que se encuentran en exceso en la dieta para exportarlos a otros tejidos. Durante la inanición, pueden reciclarse lípidos mediante autofagia. Por término medio, los triacilgliceroles de la dieta suministran el 40% o más del total de energía requerido diariamente por los humanos en países altamente industrializados (a pesar de que la mayoría de recomendaciones dietéticas sugieren que el aporte calórico diario debido a las grasas no supere el 30%). Los triacilgliceroles cubren más de la mitad de las necesidades energéticas de algunos órganos, especialmente del hígado, corazón y músculo esquelético en reposo. Los triacilgliceroles almacenados son prácticamente la única fuente de energía utilizada por los animales en hibernación y por las aves migratorias. Los protistas obtienen grasas al consumir organismos situados por debajo de ellos en la cadena trófica, y algunos también almacenan grasas en gotículas de lípido citosólicas. Las plantas vasculares movilizan las grasas almacenadas en las semillas durante el proceso de la germinación pero, por lo demás, no dependen de las grasas para cubrir sus necesidades energéticas.

Las grasas de la dieta se absorben en el intestino delgado

En los vertebrados, antes de poder ser absorbidos a través de la pared intestinal, los triacilgliceroles ingeridos en forma de partículas macroscópicas insolubles de grasa deben convertirse en micelas microscópicas finamente dispersadas. Esta solubilización se lleva a cabo por sales biliares tales como el ácido taurocólico que se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, se almacenan en la vesícula biliar y se liberan al intestino delgado

COPY-SPARTION

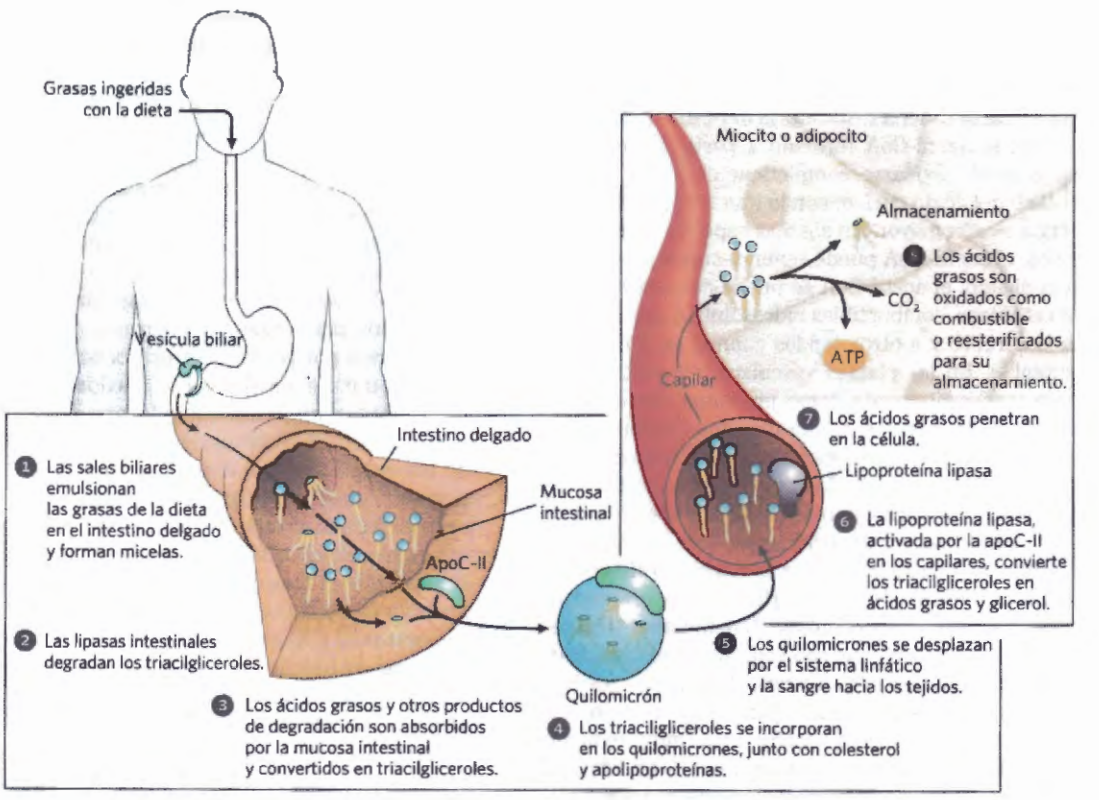


FIGURA 17-1 Ruta de los lípidos de la dieta en los vertebrados. La digestión y absorción de los lípidos de la dieta tiene lugar en el intestino delgado, y los ácidos grasos liberados de los triacilgliceroles se empaquetan y envían a los tejidos muscular y adiposo. Los ocho pasos se explican en el texto.

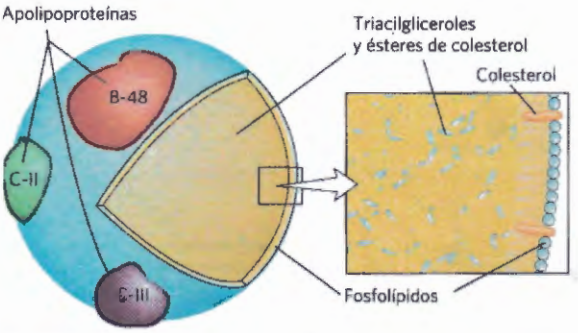


FIGURA 17-2 Estructura molecular de un quilomicrón. La superficie está constituida por una capa de fosfolípidos, con los grupos de cabeza encarados hacia la fase acuosa. Los triacilgliceroles secuestrados en el interior (en amarillo) representan más del 80% de la masa. Varias apolipoproteínas que sobresalen de la superficie (B-48, C-II, C-III) actúan como señales para la captación y metabolismo del contenido de los quilomicrones. El diámetro de los quilomicrones oscila entre 100 y 500 nm.

después de la ingestión de una comida que contenga grasas. Las sales biliares son compuestos anfipáticos que actúan como detergentes biológicos, convirtiendo las grasas de la dieta en micelas mixtas de ácidos biliares y triacilgliceroles (**Fig. 17-1**, paso ❶). La formación de micelas incrementa enormemente la fracción de moléculas de lípido accesibles a la acción de las lipasas hidrosolubles en el intestino, que convierten los triacilgliceroles en monoacilgliceroles (monoglicéridos) y diacilgliceroles (diglicéridos), ácidos grasos libres y glicerol (paso ❷). Estos productos de la acción de las lipasas difunden hacia el interior de las células epiteliales que recubren la superficie intestinal (la mucosa intestinal) (paso ❸), donde se convierten de nuevo en triacilgliceroles y se empaquetan junto con colesterol de la dieta y proteínas específicas para formar agregados lipoproteicos denominados **quilomicrones** (**Fig. 17-2**; véase también la Fig. 17-1, paso ❹).

Las **apolipoproteínas** son proteínas que se unen a lípidos en la sangre, y son responsables del transporte de triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los diferentes órganos. Las apolipoproteínas ("apo" significa separado y se refiere a la proteína en su forma libre de lípido) se combinan con lípidos para formar varias clases de partículas de **lipoproteínas**, agregados esféricos que contienen lípidos hidrofóbicos en el núcleo y cadenas laterales hidrofílicas de las proteínas y grupos de cabeza de los lípidos en la superficie. Diversas combinaciones de lípidos y proteínas producen partículas de densidad diferente, que van desde los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low-density lipoproteins*) a las lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL, *very high-density lipoproteins*), que pueden separarse por ultracentrifugación. En el Capítulo 21 se detallan las estructuras y funciones de estas partículas de lipoproteína en el transporte de lípidos.

La parte proteica de las lipoproteínas es reconocida por receptores en la superficie celular. En la captación de lípidos desde el intestino, los quilomicrones, que contienen la apolipoproteína C-II (apoC-II), pasan desde la mucosa intestinal al sistema linfático, desde el que penetran en la sangre que los transporta al músculo y al tejido adiposo (Fig. 17-1, paso ❺). En los capilares de estos tejidos, el enzima extracelular **lipoproteína lipasa**, activado por la apoC-II, hidroliza los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol (paso ❻), que son captados por transportadores específicos de las células de los tejidos diana (paso ❼). En el músculo, los ácidos grasos se oxidan para obtener energía; en el tejido adiposo, se reesterifican para su almacenamiento en forma de triacilgliceroles (paso ❽).

Lo que resta de los quilomicrones, de los que se ha retirado la mayor parte de triacilgliceroles pero que todavía contienen colesterol y apolipoproteínas, llegan al hígado a través de la sangre, y allí son captados por endocitosis con intervención de los receptores de sus apolipoproteínas. Los triacilgliceroles que entran en el hígado a través de esta ruta pueden ser oxidados para generar energía o bien para proporcionar precursores para la síntesis de cuerpos cetónicos, tal como se describe en la Sección 17.3. Cuando la dieta contiene más ácidos grasos de los necesarios de modo inmediato como combustible o como precursores, el hígado los convierte en triacilgliceroles, y éstos se empaquetan con apolipoproteínas específicas para formar VLDL. Estas VLDL se secretan por los hepatocitos y son transportadas en la sangre a los tejidos adiposos, donde los triacilgliceroles son eliminados y almacenados en forma de gotículas de lípido en el interior de los adipocitos.

Las hormonas activan la movilización de triacilgliceroles almacenados

Los lípidos neutros se almacenan en adipocitos (y en células sintetizadoras de esteroides en la corteza adrenal, ovario y testículos) en forma de **gotículas de lípido** que contienen un núcleo de ésteres del colesterol y triacilgliceroles rodeados por una monocapa de fosfolípidos. La superficie de estas gotículas está revestida con **perilipinas,** una familia de proteínas que restringen el acceso a las gotículas de lípido impidiendo su movilización inoportuna. Cuando las hormonas señalan que existe una necesidad de energía metabólica, se movilizan (se extraen del almacenamiento) las reservas de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo y se transportan a los tejidos (músculo esquelético, corazón, corteza suprarrenal) en los que pueden oxidarse ácidos grasos para producir energía. Las hormonas adrenalina y glucagón , secretadas en respuesta a niveles bajos de glucosa en sangre o a una situación de lucha o huida, activan el enzima adenilil ciclasa de la membrana plasmática de los adipocitos (**Fig. 17-3**), el cual produce el segundo mensajero intracelular AMP cíclico (cAMP; véase la Fig. 12-4). La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) desencadena cambios que abren la gotícula de lípido exponiéndola a la acción de tres lipasas, que actúan sobre tri-, di- y monoacilgliceroles, con liberación de ácidos grasos y glicerol.

Los ácidos grasos así liberados **(ácidos grasos libres, FFA)** pasan desde los adipocitos a la sangre, donde se unen a la proteína sanguínea **albúmina sérica** (Fig. 17-3). Esta proteína (M_r 66.000), que representa aproximadamente la mitad de la proteína total del suero, llega a unir de forma no covalente hasta 10 ácidos grasos por monómero de proteína. Unidos a esta proteína soluble, los ácidos grasos antes insolubles son trans-

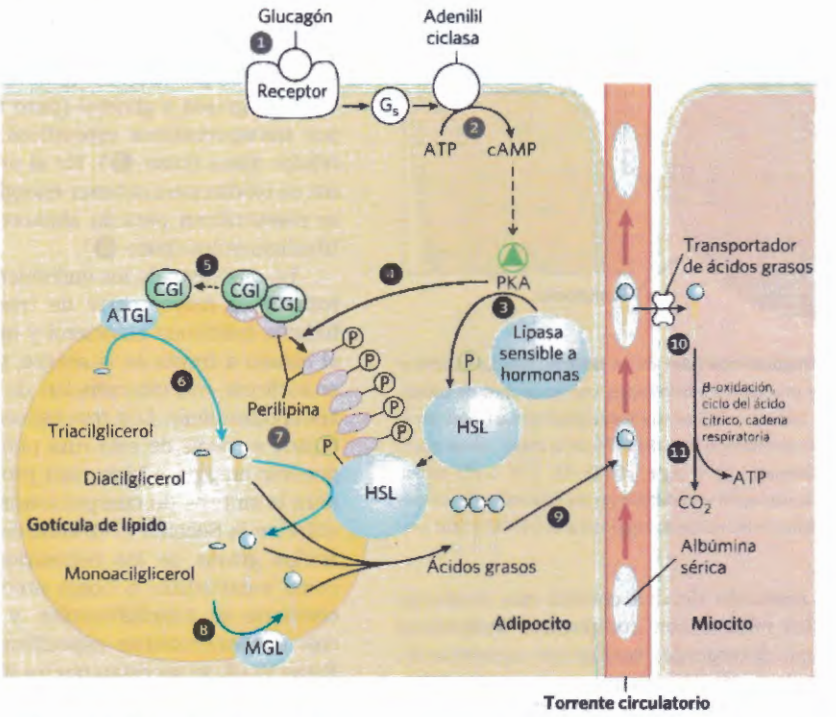


FIGURA 17-3 Movilización de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo. Niveles bajos de glucosa en sangre activan la liberación de glucagón, ❶ la hormona se une a su receptor en la membrana del adipocito y así ❷ estimula la adenilil ciclasa, vía una proteína G, para producir cAMP. Esto activa la PKA, que fosforila ❸ la lipasa sensible a hormona (HSL) y ❹ moléculas de perilipina de la superficie de la gotícula de lípido. La fosforilación de la perilipina provoca ❺ la disociación de la proteína CGI de la perilipina. La CGI recluta entonces el enzima del tejido adiposo triacilglicerol lipasa (ATGL), llevándolo a la superficie de la gotícula con lo que se estimula su actividad lipasa. La ATGL activa convierte ❻ los triacilgliceroles en diacilgliceroles. La perilipina fosforilada se asocia con HSL forforilada, permitiendo su acceso a la superficie de la gotícula de lípido, en donde ❼ convierte los diacilgliceroles en monoacilgliceroles. ❽ Una tercera monoacilglicerol lipasa (MGL) hidroliza monoacilgliceroles. ❾ Los ácidos grasos abandonan el adipocito, y se transportan en la sangre unidos a la albúmina sérica. Se liberan de la albúmina y ❿ entran en un miocito mediante un transportador específico de ácidos grasos ⓫. En el miocito, los ácidos grasos se oxidan a CO_2 al tiempo que la energía de oxidación se conserva en forma de ATP, el cual promueve la contracción muscular y otros procesos metabólicos que requieren energía en el miocito.

COPY STATION

portados a tejidos tales como el músculo esquelético, el corazón y la corteza suprarrenal. En estos tejidos diana, los ácidos grasos se disocian de la albúmina y son transportados por transportadores de la membrana plasmática al interior de las células para servir de combustible.

Aproximadamente el 95% de la energía biológicamente disponible en los triacilgliceroles reside en sus tres ácidos grasos de cadena larga; la parte glicerol sólo contribuye en un 5%. El glicerol liberado por la acción de la lipasa es fosforilado por la **glicerol quinasa (Fig. 17-4)**, y el glicerol 3-fosfato resultante se oxida a dihidroxiacetona fosfato. El enzima glucolítico triosa fosfato isomerasa convierte este compuesto en gliceraldehído 3-fosfato, que se oxida en la glucólisis.

Los ácidos grasos son activados y transportados al interior de las mitocondrias

Los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en las células animales se localizan en la matriz mitocondrial, como demostraron Eugene P. Kennedy y Albert Lehninger en 1948. Los ácidos grasos con longitudes de cadena de 12 o menos carbonos entran en la mitocondria sin la ayuda de transportadores de membrana. Aquéllos con 14 o más carbonos, que constituyen la mayoría de los FFA obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales: deben someterse antes a las tres reacciones enzimáticas de la **lanzadera de la carnitina.** La primera de ellas está catalizada por una familia de isozimas de la **acil-CoA-sintetasa** , cada una de las cuales es específica para ácidos grasos que tienen cadenas carbonadas ya sea cortas, intermedias o largas. Los isozimas están presentes en la membrana mitocondrial externa ren donde llevan a cabo la reacción general

$$\text{Ácido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil graso-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Así, las acil-CoA sintetasas catalizan la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del ácido graso y el grupo tiol del coenzima A para generar un **acil graso-CoA**, acoplada a la escisión de ATP a AMP y PP_i. (Recuerde la descripción de esta reacción en el Capítulo 13, para ilustrar de qué modo la energía libre desprendida en la escisión de los enlaces fosfoanhídrido del ATP puede acoplarse a la formación de un compuesto de alta energía; p. 514). La reacción tiene lugar en dos pasos e implica la formación de un intermedio acil graso-adenilato **(Fig. 17-5)**.

Los acil graso-CoA, al igual que el acetil-CoA, son compuestos de alta energía; su hidrólisis a FFA y CoA tiene una variación grande y de signo negativo de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ}$ = -31 kJ/mol). La formación de un acil graso-CoA se hace más favorable mediante la hidrólisis de *dos* enlaces de alta energía en el ATP; el pirofosfato formado en la reacción de activación es

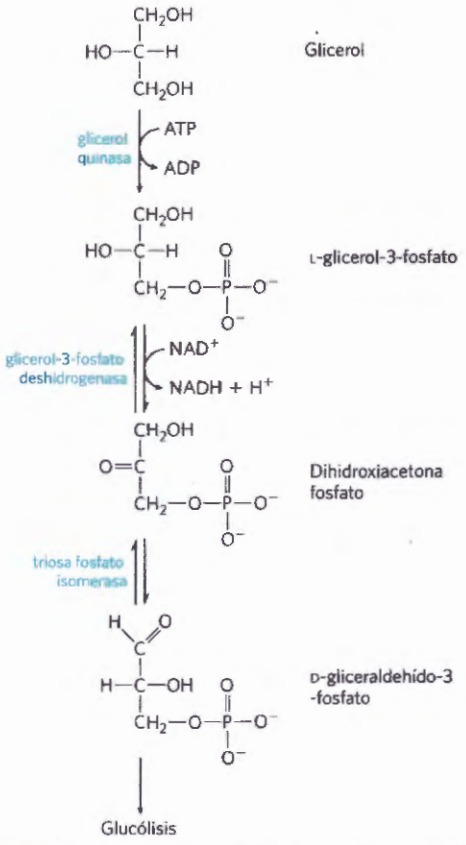


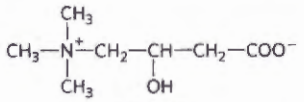
FIGURA 17-4 Entrada del glicerol en la ruta glucolítica.

COPY-STATION

hidrolizado inmediatamente por una pirofosfato inorgánico hidrolasa (Fig. 17-5, izquierda), que empuja la reacción de activación precedente en la dirección de formación de acil graso-CoA. La reacción global es

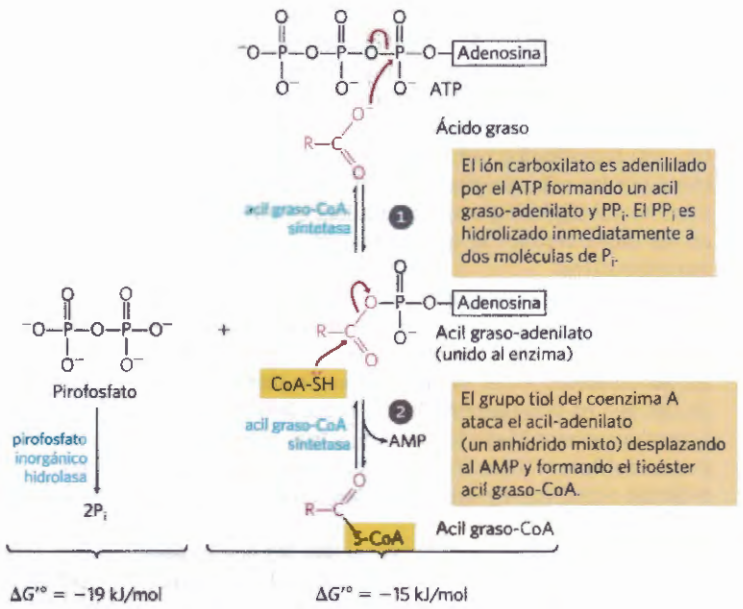
$$\text{Ácido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil graso-CoA} + \text{AMP} + 2\,P_i \qquad (17\text{-}1)$$
$$\Delta G'^{\circ} = -34 \text{ kJ/mol}$$

Los ésteres de acil graso-CoA formados en el lado citosólico de la membrana mitocondrial externa pueden transportarse al interior de la mitocondria y ser oxidados para producir ATP, o pueden utilizarse en el citosol para sintetizar lípidos de membrana. Los ácidos grasos destinados a la oxidación mitocondrial se unen transitoriamente al grupo hidroxilo de la **carnitina** para formar acil-carnitina, segunda reacción de la lanzadera.



Esta transesterificación es catalizada por la **carnitina aciltransferasa 1(también denominada carnitina palmitiltransferasa 1, CPT1)** de la membrana externa **(Fig. 17-6)**. El acil-CoA se convierte en el éster de carnitina y pasa a través de la membrana externa. El éster acil graso-carnitina difunde a continuación a través del espacio intermembrana y penetra en la matriz por transporte pasivo mediante el **cotransportador de acil-carnitina/carnitina** de la membrana mitocondrial interna. Este cotransportador desplaza una molécula de carnitina desde la matriz al espacio intermembrana al tiempo que una molécula de acil graso-carnitina se desplaza a la matriz.

En el tercer y último paso de la lanzadera de carnitina, el grupo acilo graso se transfiere desde la carnitina al coenzima A intramitocondrial por la **carnitina aciltransferasa 2** (también denominada **CPT2**). Este isozima, localizado en la cara interna de la membrana mitocondrial interna, regenera el acil graso-CoA y lo libera, junto con carnitina libre, al interior de la matriz (Fig. 17-6). Este proceso en tres pasos para la transferencia de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria (esterificación con el CoA, transesterificación con la carnitina seguida de transporte, y transesterificación de nuevo con CoA) une dos fondos (pools) separados de coenzima A y de acil graso-CoA, uno en el citosol y



MECANISMO FIGURA 17-5 **Activación de un ácido graso por conversión en un acil graso-CoA.** La conversión está catalizada por la acil graso-CoA sintetasa y la pirofosfato inorgánico hidrolasa. La activación del ácido graso mediante la formación del derivado acil graso-CoA se produce en dos pasos. La reacción global es muy exergónica.

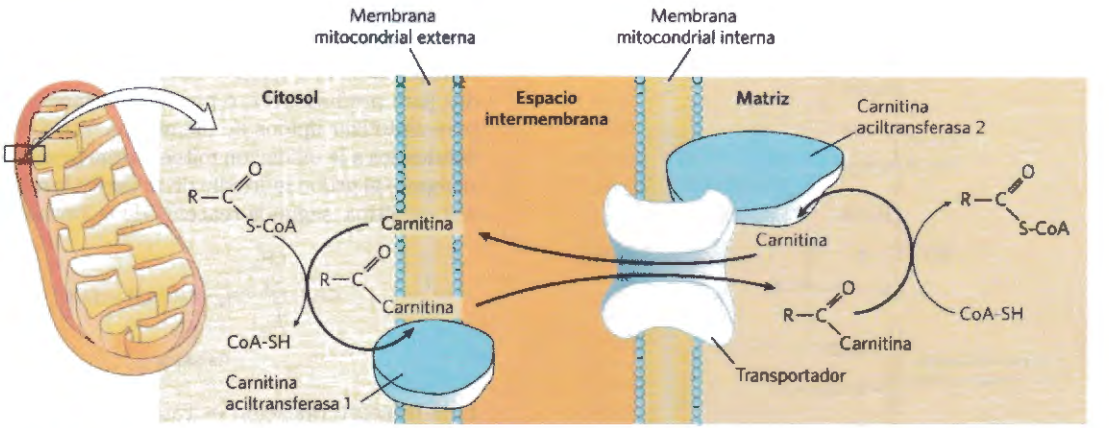


FIGURA 17-6 Entrada de los ácidos grasos en la mitocondria a través del transportador acil-carnitina/carnitina. Después de su formación en la membrana externa o en el espacio intermembrana, el acil graso-carnitina penetra en la matriz por transporte pasivo a través de la membrana interna. En la matriz, el grupo acilo se transfiere al CoA mitocondrial, liberando carnitina que retorna al espacio intermembrana utilizando el mismo transportador. La carnitina aciltransferasa 1 es inhibida por el manolil-CoA, el primer intermediario de la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21-2). Esta inhibición impide la síntesis y degradación simultáneas de ácidos grasos.

otro en la mitocondria. Estos dos fondos tienen funciones diferentes. El coenzima A de la matriz mitocondrial se usa fundamentalmente en la degradación oxidativa de piruvato, ácidos grasos y algunos aminoácidos, mientras que el coenzima A citosólico se utiliza en la biosíntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21-10). El acil graso-CoA del fondo citosólico se puede utilizar allí para la síntesis de lípidos de membrana o se puede transportar a la matriz mitocondrial para oxidación y producción de ATP. La conversión en el éster de carnitina compromete la porción acilo graso a un destino oxidativo.

El proceso de entrada en el que interviene la carnitina es el paso limitante de la velocidad de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias y, como se verá posteriormente, es un punto de control. Una vez en el interior de la mitocondria, el acil graso-CoA es procesado rápidamente por parte de un grupo de enzimas de la matriz.

RESUMEN 17.1 Digestión, movilización y transporte de grasas

- Los ácidos grasos de los triacilgliceroles proporcionan una fracción importante de la energía oxidativa en los animales. Los triacilgliceroles ingeridos con la dieta se emulsionan en el intestino delgado con las sales biliares, son hidrolizados por las lipasas intestinales, absorbidos por las células epiteliales del intestino, reconvertidos en triacilgliceroles y, a continuación, incorporados en los quilomicrones al combinarse con apolipoproteínas específicas.
- Los quilomicrones aportan triacilgliceroles a los tejidos, donde la lipoproteína lipasa libera los ácidos grasos para que entren en las células. Los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo se movilizan por acción de una triacilglicerol lipasa sensible a hormonas. Los ácidos grasos liberados se unen a la albúmina sérica y son transportados a través de la sangre al corazón, músculo esquelético y otros tejidos que utilizan los ácidos grasos como combustible.
- Una vez en el interior de las células, los ácidos grasos se activan en la membrana mitocondrial externa por conversión a tioésteres acil graso-CoA. Los acil graso-CoA que se han de oxidar entran en la mitocondria en tres pasos por la vía de la lanzadera de carnitina.

17.2 Oxidación de los ácidos grasos

Tal como se ha señalado anteriormente, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos se produce en tres fases **(Fig. 17-7)**. En la primera fase -la β-oxidación- los ácidos grasos experimentan la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA, a partir del extremo carboxilo de la cadena de ácido graso. Por ejemplo, el ácido palmítico, de 16 átomos de carbono, (palmitato a pH 7), se somete siete veces a esta secuencia oxidativa, perdiendo en cada uno de los pasos dos carbonos en forma de acetil-CoA. Al final de los siete ciclos, los dos últimos átomos de carbono del palmitato (originalmente C-15 y C-16) quedan en forma de acetil-CoA. El resultado global es la conversión de la cadena de 16 carbonos del palmitato en ocho grupos acetilo de dos carbonos de moléculas de acetil-CoA. La formación de cada acetil-CoA requiere la eliminación de cuatro átomos de hidrógeno (dos pares de electrones y cuatro H^+) de la parte acilo graso por parte de deshidrogenasas.

En la segunda fase de la oxidación de ácidos grasos, los grupos acetilo del acetil-CoA se oxidan a CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, que también tiene lugar en la matriz mitocondrial. El acetil-CoA procedente de ácidos grasos entra de este modo en una ruta oxidativa final común junto con acetil-CoA procedente de la glucosa vía glucólisis y oxidación del piruvato (véase la Fig. 16-1). Las dos primeras fases de la oxidación de ácidos grasos producen los transportadores electrónicos reducidos NADH y $FADH_2$ que, en la tercera fase, ceden sus electrones a la cadena respiratoria mitocondrial, a través de la cual se transportan los electrones al oxígeno, con la fosforilación concomitante de ADP a ATP (Fig. 17-7). De este modo, la energía liberada por la oxidación de los ácidos grasos se conserva en forma de ATP.

Describiremos a continuación con mayor detalle la primera fase de la oxidación de los ácidos grasos, empe-

COPY-STATION

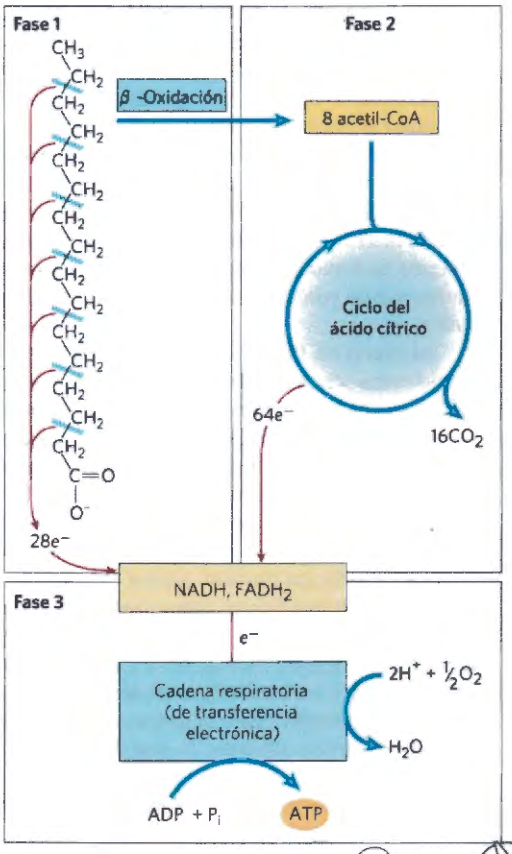


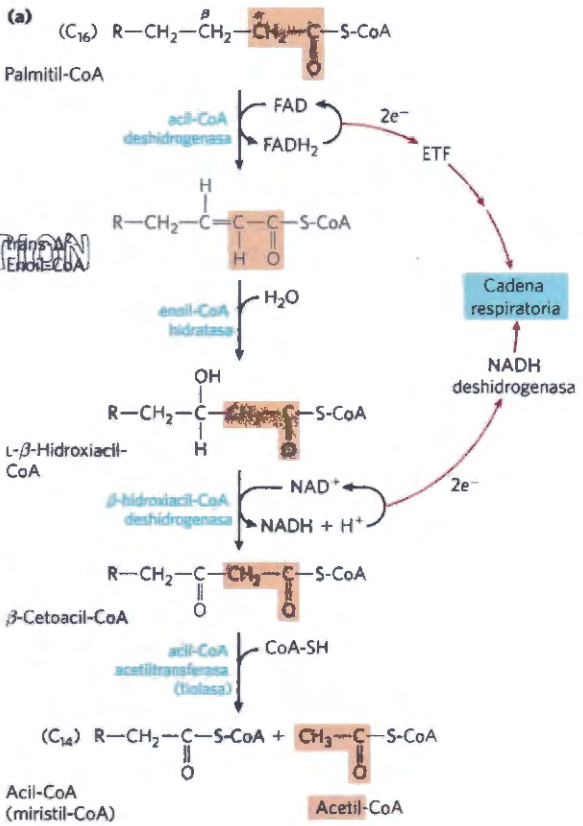
FIGURA 17-7 Fases de la oxidación de los ácidos grasos. Fase 1: El ácido graso de cadena larga se oxida para generar residuos acetilo en forma de acetil-CoA. Este proceso se denomina β-oxidación. Fase 2: Los grupos acetilo se oxidan a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Fase 3: Los electrones obtenidos en las oxidaciones de las fases 1 y 2 se transfieren al O_2 a través de la cadena respiratoria mitocondrial, proporcionando la energía necesaria para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa.

zando por el caso sencillo de una cadena acilo graso saturada con número par de átomos de carbono y, a continuación, el caso ligeramente más complicado de cadenas no saturadas y de número impar. Veremos a continuación la regulación de la oxidación de ácidos grasos, los procesos β-oxidativos que se dan en otros orgánulos que no son la mitocondria y, finalmente, dos formas menos generales del catabolismo de los ácidos grasos, la α oxidación y la ω oxidación.

La β-oxidación de los ácidos grasos saturados se produce en cuatro pasos básicos

Cuatro reacciones catalizadas por enzimas constituyen la primera fase de la oxidación de ácidos grasos **(Fig. 17-8a)**. En primer lugar, la deshidrogenación del acil graso-CoA genera un doble enlace entre los átomos de carbono α y β (C-2 y C-3), dando lugar a un ***trans*-Δ^2-enoil-CoA** (el símbolo Δ^2 designa la posición del doble enlace; puede ser de utilidad revisar la nomenclatura de ácidos grasos, p. 361). Observe que el nuevo doble enlace tiene configuración trans, mientras que los ácidos grasos insaturados naturales tienen normalmente sus enlaces dobles en configuración cis. Más tarde veremos el significado de esta diferencia.

Este primer paso está catalizado por tres isozimas de la **acil-CoA deshidrogenasa** cada uno específico para un intervalo de longitudes de la cadena del ácido graso: la acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa (VLCAD, "very *long-chain acyl-CoA-dehydrogenase*") actúa sobre ácidos graso de 12 a 18 carbonos, y los



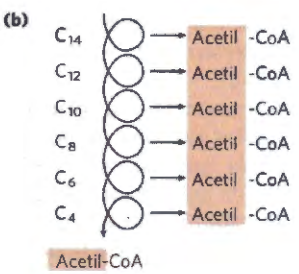


FIGURA 17-8 Ruta de la β-oxidación. (a) En cada uno de los pases a través de esta secuencia de cuatro pasos, un grupo acetilo (sombreado en rojo claro) es eliminado en forma de acetil-CoA del extremo carboxilo de la cadena del ácido graso, en este ejemplo palmitato (C_{16}), que entra en forma de palmitil-CoA. Los electrones de la primera oxidación pasan a través de la flavoproteína ETF y, a continuación, a través de una segunda flavoproteína, a la cadena respiratoria. Los electrones de la segunda oxidación entran en la cadena respiratoria a través de la NADH deshidrogenasa (véase la Fig. 19-15) **(b)** Seis pases más a través de la vía de la β-oxidación generan siete nuevas moléculas de acetil-CoA, la séptima de las cuales procede de los dos últimos átomos de carbono de la cadena de 16 carbonos. En total se forman ocho moléculas de acetil-CoA. El acetil-CoA se puede oxidar en el ciclo del ácido cítrico donando más electrones a la cadena respiratoria.

isozimas específicos para ácidos grasos de cadena media (MCAD, "*medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase*") y ácidos grasos de cadena corta (SCAD, "*short-chain acyl-CoA-dehydrogenase*") actúan, respectivamente, sobre ácidos grasos de 4 a 14 y de 4 a 8 carbonos. La VLCAD se encuentra en la membrana mitocondrial interna; MCAD y SCAD en la matriz Los tres isozimas son flavoproteínas con FAD fuertemente unido (véase la Fig. 13-27) como grupo prostético. Los electrones eliminados del acil graso-CoA se transfieren al FAD, y la forma reducida de la deshidrogenasa cede inmediatamente sus electrones a un transportador electrónico de la cadena respiratoria mitocondrial, la **flavoproteína transferidora de electrones (ETF)** (véase la Fig. 19-15). La oxidación catalizada por una acil-CoA deshidrogenasa es análoga a la deshidrogenación del succinato en el ciclo del ácido cítrico; en ambas reacciones el enzima está unido a la membrana interna, se introduce un doble enlace en un ácido carboxílico entre los átomos de carbono α y β, el FAD actúa de aceptor de electrones y los electrones de la reacción entran finalmente en la cadena respiratoria y pasan al O_2, produciéndose la síntesis concomitante de alrededor de 1,5 moléculas de ATP por par de electrones.

En el segundo paso del ciclo de la β-oxidación (Fig. 17-8a), se adiciona agua al doble enlace del *trans*-Δ^2-enoil-CoA para formar el estereoisómero l del **β-hidroxiacil-CoA** (también denominado **3-hidroxiacil-CoA**). Esta reacción, catalizada por la **enoil-CoA hidratasa**, es formalmente análoga a la reacción de la fumarasa del ciclo del ácido cítrico, en la que se adiciona H_2O a un doble enlace α–β.

En el tercer paso, se deshidrogena el l-β-hidroxiacil-CoA para formar **β-cetoacil-CoA** por acción de la **β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa**; el NAD+ es el aceptor de electrones. Este enzima es absolutamente específico para el estereoisómero l del hidroxiacil-CoA. El NADH formado en esta reacción dona sus electrones a la **NADH deshidrogenasa**, un transportador electrónico de la cadena respiratoria, y se forma ATP a partir de ADP al pasar los electrones al O_2. La reacción catalizada por la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa es análoga a la reacción de la malato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico.

El cuarto y último paso del ciclo de la β-oxidación está catalizado por la **acil-CoA acetiltransferasa**, más comúnmente denominada **tiolasa**, que promueve la reacción entre el β-cetoacil-CoA y una molécula de coenzima A libre para dar lugar a la separación del fragmento carboxilo terminal de dos carbonos de la cadena original de ácido graso en forma de acetil-CoA. El otro producto es el tioéster de coenzima A del ácido graso con dos carbonos menos (Fig. 17-8a). Esta reacción se conoce como tiólisis, por analogía con el proceso de hidrólisis, dado que el β-cetoacil-CoA se rompe por reacción con el grupo tiol del coenzima A. La reacción de la tiolasa es el inverso de una condensación de Claisen (véase la Fig. 13-4).

Los tres últimos pasos de esta secuencia de cuatro pasos están catalizados por uno de dos conjuntos de enzimas, según sea la longitud de la cadena de acilo graso. Para cadenas de acilo graso de 12 o más carbonos, las reacciones están catalizadas por un complejo multienzimático asociado a la membrana mitocondrial interna, la **proteína trifuncional (TFP).** La TFP es un heterooctámero de subunidades $\alpha_4\beta_4$. Cada subunidad α contiene dos actividades, la enoil-CoA hidratasa y la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; las subunidades β contienen la actividad tiolasa. Esta estrecha asociación de tres enzimas puede permitir la canalización eficiente del sustrato de un sitio activo al siguiente sin difusión de los intermediarios desde la superficie enzimática. Cuando la TFP ha acortado la cadena de acilo graso a 12 o menos carbonos, las siguientes oxidaciones son catalizadas por un conjunto de cuatro enzimas solubles de la matriz.

Tal como se ha señalado anteriormente, el enlace simple entre los grupos metileno (—CH_2—) de los ácidos grasos es relativamente estable. La secuencia de la β-oxidación constituye un mecanismo elegante para desestabilizar y romper estos enlaces. Las primeras tres reacciones de la β-oxidación crean un enlace C—C mucho menos estable, en el que el carbono α (C-2) está unido a *dos* carbonos carbonílicos (el intermediario β-cetoacil-CoA). La función cetona del carbono β (C-3) lo convierte un una buena diana para el ataque nucleofílico a cargo del -SH del coenzima A, catalizado por la tiolasa. La acidez del hidrógeno α y la estabilización por resonancia del carbanión generado por la pérdida de este hidrógeno convierten al grupo —CH_2—CO—S-CoA en un buen grupo saliente, lo que facilita la rotura del enlace α–β.

Ya hemos visto una secuencia de reacciones casi idéntica con estos cuatro pasos de la oxidación de ácidos grasos en las reacciones del ciclo del ácido cítrico entre el succinato y el oxalacetato (véase la Fig. 16-7). Una secuencia de reacciones casi idéntica tiene lugar también en la ruta mediante la que los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina) se oxidan en tanto que combustibles (véase la Fig. 18-28). La **Figura 17-9** muestra las características comunes de estas tres secuencias, casi con toda certeza un ejemplo de conservación de un mecanismo por duplicación génica y evolución de una nueva especificidad en los productos enzimáticos de los genes duplicados.

COPY-STATION

Los cuatro pasos de la β-oxidación se repiten para generar acetil-CoA y ATP

En un paso a través de la secuencia de la β-oxidación, se eliminan una molécula de acetil-CoA, dos pares de electrones y cuatro protones (H^+) del acil graso-CoA de cadena larga, acortándolo en dos átomos de carbono. La ecuación correspondiente a un solo paso, comenzando con el éster de coenzima A de nuestro ejemplo, el palmitato, es

$$\text{Palmitil-CoA} + \text{CoA} + \text{FAD} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{miristil-CoA} + \text{acetil-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (17\text{-}2)$$

Después de la eliminación de una unidad de acetil-CoA del palmitil-CoA, queda el tioéster de coenzima A del ácido graso de cadena acortada (en este caso el miristato de 14 carbonos). El miristil-CoA puede volver a entrar ahora en otra serie de cuatro reacciones de β-oxidación, exactamente análogas a las primeras, para generar una segunda molécula de acetil-CoA y lauril-CoA, el tioéster del coenzima A y el laurato de 12 carbonos. En total se requieren siete pasos a través de

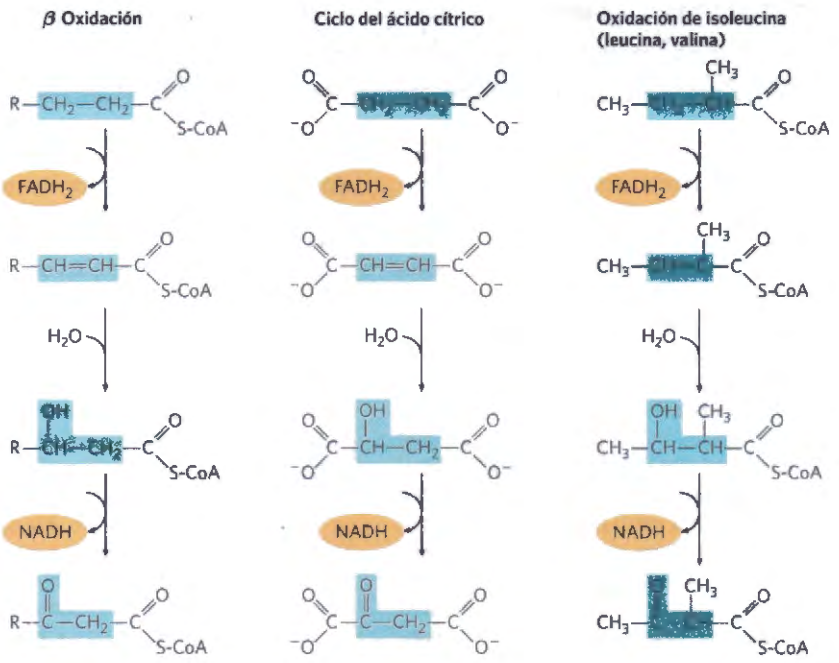


FIGURA 17-9 Secuencia de reacciones conservada que introduce una función carbonilo en el carbono β respecto a un grupo carboxilo. La ruta de la β-oxidación de los acil grasos-CoA, la ruta del succinato al oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico y la ruta mediante la que los esqueletos carbonados desaminados de la isoleucina, leucina y valina se oxidan como combustibles, utilizan la misma secuencia de reacciones.

la secuencia de la β-oxidación para oxidar una molécula de palmitil-CoA a ocho moléculas de acetil-CoA (Fig. 17-8b). La reacción global es

$$\text{Palmitil-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+ \quad (17\text{-}3)$$

Cada molécula de $FADH_2$ formada durante la oxidación del ácido graso cede un par de electrones a la ETF de la cadena respiratoria y se generan alrededor de 1,5 moléculas de ATP durante la posterior transferencia de cada par de electrones al O_2. De modo similar, cada molécula de NADH formada libera un par de electrones a la NADH deshidrogenasa mitocondrial, y la posterior transferencia de cada par de electrones al O_2 tiene como resultado la formación de alrededor de 2,5 moléculas de ATP. Así, en cada uno de los pasos a través de la secuencia, se forman cuatro moléculas de ATP por cada unidad de dos carbonos eliminada. Obsérvese que en este proceso se produce también agua. La transferencia de cada par de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ al O_2 da lugar a la formación de una molécula de H_2O copnocida como "agua metabólica". La reducción del O_2 por el NADH consume también un H^+ por molécula de NADH: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD+ + H_2O$. En los animales que hibernan, la oxidación de ácidos grasos proporciona energía metabólica, calor y agua - todos ellos esenciales para la supervivencia de un animal que no come ni bebe durante largos períodos de tiempo (Recuadro 17-1). Los camellos obtienen agua para suplementar el escaso suministro disponible en su medio natural, a través de la oxidación de grasas almacenadas en sus jorobas.

La ecuación global de la oxidación del palmitil-CoA a ocho moléculas de acetil-CoA, incluyendo la transferencia electrónica y la fosforilación oxidativa, es

$$\text{Palmitil-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{O}_2 + 28\text{P}_i + 28\text{ADP} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 28\text{ATP} + 7\text{H}_2\text{O} \quad (17\text{-}4)$$

COPY-STATION

El acetil-CoA puede continuar oxidándose vía ciclo del ácido cítrico

El acetil-CoA producido en la oxidación de los ácidos grasos puede oxidarse a CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido cítrico. La siguiente ecuación representa el balance de la segunda fase de la oxidación del palmitil-CoA, juntamente con las fosforilaciones acopladas de la tercera fase:

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 16\text{O}_2 + 80\text{P}_i + 80\text{ADP} \longrightarrow 8\text{CoA} + 80\text{ATP} + 16\text{CO}_2 + 16\text{H}_2\text{O} \quad (17\text{-}5)$$

Combinando las ecuaciones 17-4 y 17-5, obtenemos la ecuación global para la oxidación completa de palmitil-CoA a dióxido de carbono y agua:

$$\text{Palmitil-CoA} + 23\text{O}_2 + 108\text{P}_i + 108\text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 108\text{ATP} + 16\text{CO}_2 + 23\text{H}_2\text{O} \quad (17\text{-}6)$$

En la Tabla 17-1 se resumen los rendimientos de NADH, $FADH_2$ y ATP en los pasos sucesivos de la oxidación del palmitil-CoA. Puesto que la activación del palmitato a palmitil-CoA rompe los dos enlaces anhídrido fosfórico del ATP (Fig. 17-5), el coste energético de la activación de un ácido graso es equivalente a dos ATP y, por tanto, la ganancia neta por molécula de palmitato es de 106 ATP. La variación de energía libre estándar para la oxidación del palmitato a CO_2 y H_2O es de aproximadamente 9.800 kJ/mol. En condiciones estándar se recuperan 106 x 30,5 kJ/mol = 3.230 kJ/mol (aproximadamente el 33% del máximo teórico). Sin embargo, si se calculan las variaciones de energía libre a partir de las concentraciones reales de reactivos y productos en las condicio-

RECUADRO 17-1 Una siesta que dura un largo invierno: la oxidación de grasas durante la hibernación

Muchos animales dependen de sus depósitos de grasa para obtener energía durante la hibernación, durante los períodos migratorios y en otras situaciones en las que se produzcan ajustes metabólicos radicales. Uno de los ajustes más pronunciados del metabolismo lipídico se produce durante la hibernación del oso pardo. Estos animales permanecen en un letargo continuo que puede durar hasta siete meses. A diferencia de la mayoría de especies hibernantes, el oso mantiene su temperatura corporal de unos 31 °C, cercana a la normal (sin hibernar) (~40 °C). A pesar de que consume aproximadamente 25.000 kJ/día (6.000 kcal/día), el oso no come, bebe, orina ni defeca durante meses seguidos. Su ritmo cardíaco desciende desde 90 a 8 pulsaciones por minuto y su respiración disminuye desde 6 a 10 inspiraciones a aproximadamente una inspiración por minuto. Tal como veremos en el Capítulo 19, la transferencia de electrones mitocondrial puede desacoplarse de la producción de ATP por lo que toda la energía de la oxidación de combustible se disipa en forma de calor con el fin de mantener una temperatura corporal cercana a la normal frente a las temperaturas ambientales mucho más bajas.

Estudios experimentales han demostrado que el oso gris en hibernación utiliza únicamente grasa corporal como combustible. La oxidación de grasas proporciona energía suficiente para mantener la temperatura corporal, la síntesis activa de aminoácidos y proteínas y otras actividades que requieren energía, como por ejemplo el transporte a través de membranas. La oxidación de grasas también libera grandes cantidades de agua, tal como se describe en el texto, lo que repone el agua perdida en la respiración. El glicerol liberado en la degradación de los triacilgliceroles se convierte en glucosa sanguínea a través de la gluconeogénesis. La urea formada durante la degradación de aminoácidos es reabsorbida en los riñones y reciclada, siendo utilizados los grupos amino para formar nuevos aminoácidos para mantener las proteínas corporales.

Los osos almacenan una cantidad enorme de grasa corporal en preparación para su largo sueño. Un oso pardo adulto consume unos 38,000 kJ/día durante el final de la primavera y el verano, pero al aproximarse el invierno, los oso se alimentan durante 20 horas al día y consumen hasta 84.000 kJ diariamente. Este aumento en la alimentación es una respuesta a un cambio estacional en la secreción hormonal. A partir de la enorme cantidad de glúcidos consumidos durante el período de alimentación intensiva se forman grandes cantidades de triacilgliceroles. El oso emergirá de la hibernación habiendo perdido del 15% al 40% de su peso corporal máximo.

El sueño invernal de los osos se denomina, a veces, letargia y difiere en aspectos importantes del comportamiento hibernante de un grupo de pequeños animales que experimentan períodos alternos de temperatura corporal alta y baja. En estos animales, la temperatura corporal se acerca a la temperatura ambiente, próxima a 0 °C, durante gran parte del tiempo de hibernación, pero aumenta casi al nivel pre-hibernal durante breves períodos de vigilia. Durante estos períodos, los animales comen, beben y defecan. En la ardilla ártica (*Urocitellus parryii*), por ejemplo, la temperatura corporal (37 °C pre-hibernación) disminuye a 0 °C durante la hibernación mientras que la respiración disminuye a menos del 10% del ritmo pre-hibernación.

Estudios sobre los mecanismos de hibernación pueden proporcionar conocimientos acerca de diversos problemas de la medicina humana; por ejemplo, reducir la velocidad del metabolismo de órganos donados para transplante podría extender su período de viabilidad. Y si las personas han de realizar largos viajes al espacio, la inducción de un estado similar a la letargia podría aliviar la monotonía de las misiones largas así como conservar recursos a bordo tales como alimentos y oxígeno.



Un oso pardo prepara su nido de hibernación, cerca del río McNeil en Canadá.
[Fuente: Stouffer Productions/ Animals Animals]

TABLA 17-1 Rendimiento en ATP de la oxidación de una molécula de palmitil-CoA a CO_2 y H_2O

Enzima que cataliza cada paso	Número de NADH o $FADH_2$ formados	Número de ATP formados finalmente[a]
β-Oxidación		
Acil-CoA deshidrogenasa	7 $FADH_2$	10,5
β-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	7 NADH	17,5
Ciclo del ácido cítrico		
Isocitrato deshidrogenasa	8 NADH	20
α-Cetoglutarato deshidrogenasa	8 NADH	20
Succinil-CoA sintetasa		8[b]
Succinato deshidrogenasa	8 $FADH_2$	12
Malato deshidrogenasa	8 NADH	20
Total		108

[a]Estos cálculos suponen que la fosforilación oxidativa mitocondrial produce 1,5 ATP por $FADH_2$ oxidado y 2,5 ATP por NADH oxidado.
[b]El GTP producido directamente en este paso genera ATP en una reacción catalizada por la nucleósido difosfato quinasa.

nes intracelulares (véase el Ejemplo práctico 13-2, p. 509), la recuperación de energía libre es de más del 60%; la conservación de energía es notablemente eficiente.

La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos reacciones adicionales

La secuencia de oxidación de ácidos grasos que acabamos de describir es típica de los ácidos grasos saturados (esto es, que poseen solamente enlaces sencillos en su cadena carbonada). Sin embargo, la mayoría de los ácidos grasos de los triacilgliceroles y fosfolípidos de animales y plantas son insaturados, con uno o más enlaces dobles. Estos enlaces se encuentran en la configuración cis y no pueden actuar como sustratos de la enoil-CoA hidratasa, el enzima que cataliza la adición de H_2O al doble enlace en trans del Δ^2-enoil-CoA generado durante la β-oxidación. Se necesitan dos enzimas adicionales para la β-oxidación de los ácidos grasos insaturados comunes: una isomerasa y una reductasa. Se ilustrará la función de estas reacciones auxiliares con dos ejemplos.

El oleato es un ácido graso monoinsaturado abundante, de 18 átomos de carbono con un doble enlace en cis entre el C-9 y el C-10 (cuya notación es Δ^9). En el primer paso de la oxidación, el oleato se convierte en oleil-CoA que, al igual que los ácidos grasos saturados entra en la matriz mitocondrial vía lanzadera de la carnitina (Fig. 17-6). A continuación el oleil-CoA pasa por tres veces a través del ciclo de oxidación de ácidos grasos para generar tres moléculas de acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso insaturado Δ^3 de 12 carbonos, el *cis*- Δ^3 -dodecenoil-CoA **(Fig. 17-10)**. Este producto no sirve como sustrato para la enoil-CoA hidratasa, que solamente actúa sobre los enlaces dobles en trans. El enzima auxiliar **Δ^3,Δ^2-enoil-CoA isomerasa** isomeriza el *cis*-Δ^3-enoil-CoA para dar lugar a *trans*-Δ^2-enoil-CoA, que es convertido por la enoil-CoA hidratasa en el correspondiente l-β-hidroxiacil-CoA (*trans*-Δ^2-dodecenoil-CoA). Sobre este intermediario actúan ahora los restantes enzimas de la β-oxidación para generar acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso saturado de 10 carbonos, decanil-CoA. Este último sufre cuatro pases más a través de la ruta para dar otras cinco moléculas de acetil-CoA. En total, se producen nueve moléculas de acetil-CoA a partir de una molécula de oleato de 18 carbonos.

El otro enzima auxiliar (una reductasa) actúa en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados -por ejemplo el linoleato de 18 carbonos, que tiene la configuración *cis*-Δ^9, *cis*-Δ^{12} **(Fig. 17-11)**. El linoleil-CoA pasa por tres veces a través de la secuencia de la β-oxidación y genera tres moléculas de acetil-CoA y el éster del coenzima A de un ácido graso insaturado de 12 carbonos con configuración *cis*-Δ^3, *cis*-Δ^6. Este intermediario no

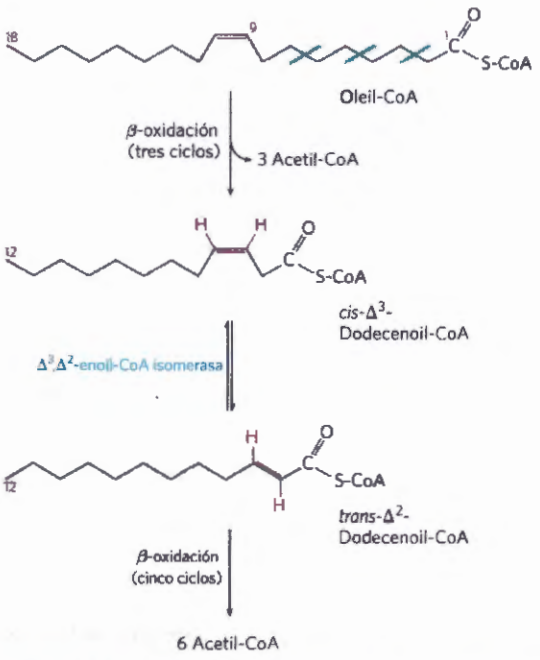


FIGURA 17-10 Oxidación de un ácido graso monoinsaturado. Se muestra como ejemplo el ácido oleico, en forma de oleil-CoA (Δ^9). La oxidación requiere un enzima adicional, la enoil-CoA isomerasa, para reposicionar el doble enlace, convirtiendo el isómero cis en el isómero trans, un intermediario normal de la β-oxidación.

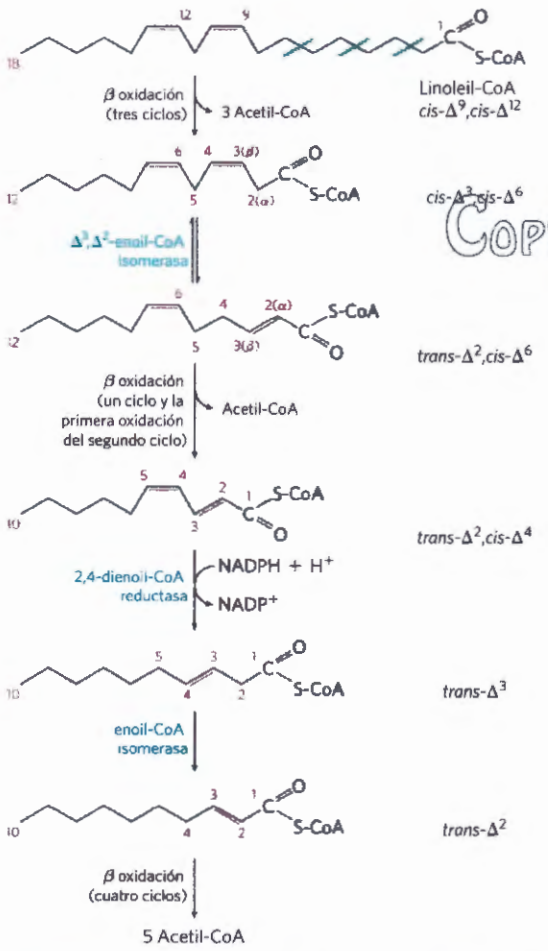
puede ser utilizado por los enzimas de la ruta de la β-oxidación; sus enlaces dobles se encuentran en posición y configuración inadecuadas (cis y no trans). Sin embargo, la acción combinada de la enoil-CoA isomerasa y la **2,4-dienoil-CoA reductasa**, tal como se muestra en la Figura 17-11, transforma este intermediario en uno que puede entrar en la ruta de la β-oxidación y su degradación a seis acetil-CoA. El resultado global es la conversión del linoleato en nueve moléculas de acetil-CoA.

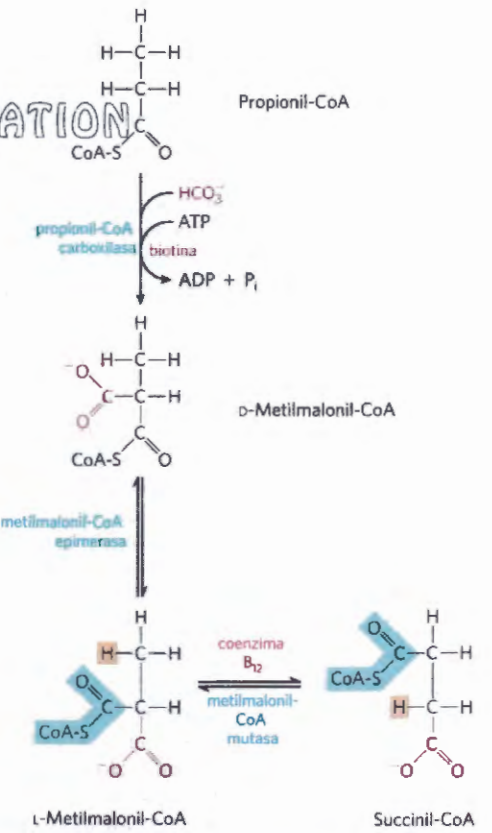
La oxidación completa de ácidos grasos de cadena impar requiere tres reacciones adicionales

A pesar de que la mayoría de lípidos naturales contienen ácidos grasos con número par de átomos de carbono, los ácidos grasos de número impar de carbonos son comunes en los lípidos de muchas plantas y algunos organismos marinos. El ganado bovino y otros rumiantes producen gran cantidad de **propionato** (CH_3—CH_2—COO^-) de tres carbonos durante la fermentación de los glúcidos en el rumen. El propionato así formado se absorbe en la sangre y es oxidado en el hígado y otros tejidos.

Los ácidos grasos de cadena larga e impar se oxidan a través de la misma ruta que los ácidos de número par de átomos de carbono, empezando por el extremo carboxilo de la cadena. Sin embargo, el sustrato del último paso a través de la secuencia de la β-oxidación es un acil graso-CoA en el que el ácido graso tiene cinco átomos de carbono. Cuando éste sufre la oxidación y rotura, los productos son acetil-CoA y **propionil-CoA**. El acetil-CoA puede oxidarse a través del ciclo del ácido cítrico, por supuesto, pero el propionil-CoA entra en una ruta enzimática diferente en la que participan tres enzimas.

En primer lugar el propionil-CoA se carboxila para formar el estereoisómero d del **metilmalonil-CoA (Fig. 17-12)** por acción de la **propionil-CoA carboxilasa,** que contiene biotina como cofactor. En esta reacción enzimática, al igual que en la reacción de la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 16-17), el CO_2 (o su ión hidratado, HCO_3^-) se activa por unión a la biotina antes de ser transferido al sustrato, en este caso el propionato. La formación del intermedio carboxibiotina requiere energía, que es proporcionada por el ATP. El d-metilma-





COPY-STATION

FIGURA 17-11 Oxidación de un ácido graso poliinsaturado. Como ejemplo se muestra el ácido linoleico, en forma de linoleil-CoA ($\Delta^{9,12}$). La oxidación requiere un segundo enzima auxiliar además de la enoil-CoA isomerasa: la 2,4-dienoil-CoA reductasa dependiente de NADPH. La acción combinada de estos dos enzimas convierte un intermediario *trans*-Δ^2,*cis*-Δ^4-dienoil-CoA en el sustrato *trans*-Δ^2-enoil-CoA necesario para la β-oxidación.

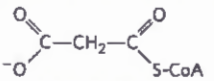
FIGURA 17-12 Oxidación del propionil-CoA producido en la β-oxidación de ácidos grasos de cadena impar. En la secuencia interviene la carboxilación del propionil-CoA a d-metilmalonil-CoA y la conversión de este último en succinil-CoA. Esta conversión requiere la epimerización de d- a l-metilmalonil-CoA, seguida por una reacción extraordinaria en la que los sustituyentes de carbonos adyacentes intercambian sus posiciones (véase el Recuadro 17-2).

lonil-CoA así formado se epimeriza enzimáticamente a su estereoisómero l por acción de la **metilmalomil-CoA epimerasa** (Fig. 17-12). El l-metilmalonil-CoA experimenta entonces una reestructuración intramolecular para formar succinil-CoA, que puede entrar en el ciclo del ácido cítrico. Esta reestructuración está catalizada por la **metilmalonil-CoA mutasa,** que requiere como coenzima **5'-desoxiadenosilcobalamina** o **coenzima B_{12}**, derivado de la vitamina B_{12} (cobalamina). El Recuadro 17-2 describe el papel del coenzima B_{12} en esta notable reacción de intercambio.

La oxidación de ácidos grasos está estrictamente regulada

La oxidación de los ácidos grasos consume un combustible precioso, y está regulada de manera que sólo tenga lugar cuando la necesidad de energía del organismo lo requiera. En el hígado, el acil graso-CoA formado en el citosol puede seguir dos rutas principales: (1) β-oxidación a cargo de enzimas mitocondriales o (2) conversión en triacilgliceroles y fosfolípidos a cargo de enzimas citosólicos. La vía escogida depende de la velocidad de transferencia de los acil graso-CoA de cadena larga a la mitocondria. El proceso de tres pasos (lanzadera de la carnitina) por el que se transportan grupos acilo grasos de los acil graso-CoA citosólicos a la matriz mitocondrial (Fig. 17-6) constituye el paso limitante de la velocidad de oxidación de ácidos grasos, y es un punto de regulación importante. Una vez los grupos acilo grasos han entrado en la mitocondria siguen obligatoriamente el proceso de oxidación hasta acetil-CoA.

La concentración de **malonil-CoA**, el primer intermediario de la biosíntesis citosólica de ácidos grasos de cadena larga a partir de acetil-CoA (véase la Fig. 21-2), aumenta siempre que el animal recibe un suministro abundante de glúcidos; el exceso de glucosa que no puede oxidarse o almacenarse en forma de glucógeno se convierte en ácidos grasos en el citosol para su almacenamiento como triacilgliceroles. La inhibición de la carnitina aciltransferasa 1 por el malonil-CoA **(Figura 17-13)** garantiza la inhibición de la oxidación de ácidos grasos siempre que el hígado reciba un suministro abundante de glucosa como combustible y fabrique activamente triacilgliceroles a partir del exceso de glucosa.



Malonil-CoA

Dos de los enzimas de la β-oxidación también están regulados por metabolitos que señalan que existe energía suficiente. Cuando la relación [NADH]/[NAD+] es elevada, la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa está inhibida; además, concentraciones elevadas de acetil-CoA inhiben la tiolasa.

Recuerde del Capítulo 15 que durante los períodos de contracción muscular vigorosa o durante el ayuno, el descenso de la [ATP] y el aumento de la [AMP] activan la AMPK, la proteína quinasa activada por AMP. La AMPK fosforila diversos enzimas diana, entre ellos la acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la síntesis de malonil-CoA. Esta fosforilación y, en consecuencia, la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa disminuye la concentración de malonil-CoA, y elimina la inhibición del

Copystation



FIGURA 17-13 Regulación coordinada de la síntesis y degradación de ácidos grasos. Cuando la dieta proporciona una fuente fácilmente disponible de glúcido como combustible, la β-oxidación de los ácidos grasos no es necesaria y está, por tanto, inhibida. Para la coordinación del metabolismo de los ácidos grasos son claves dos enzimas: la acetil-CoA carboxilasa (ACC), primer enzima de la síntesis de ácidos grasos (véase la Fig. 21-1) y la carnitina acil transferasa 1, que limita el transporte de ácidos grasos al interior de la matriz mitocondrial para la β-oxidación (véase la Fig. 17-6). La ingestión de una comida rica en glúcidos aumenta el nivel sanguíneo de glucosa y, así, ❶ desencadena la liberación de insulina. ❷ La proteína fosfatasa dependiente de insulina desfosforila la ACC, activándola. ❸ La ACC cataliza la formación de malonil-CoA (el primer intermediario de la síntesis de ácidos grasos) y el ❹ malonil-CoA inhibe la carnitina aciltransferasa 1, impidiendo de este modo la entrada de ácidos grasos a la matriz mitocondrial. Cuando disminuyen los niveles sanguíneos de glucosa entre las comidas, ❺ la liberación de glucagón activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) que ❻ fosforila e inactiva la ACC. La concentración de malonil-CoA desciende, la inhibición de la entrada de ácidos grasos en la mitocondria disminuye y ❼ los ácidos grasos entran a la matriz mitocondrial y ❽ se convierten en el combustible principal. Dado que el glucagón también desencadena la movilización de ácidos grasos en el tejido adiposo, empieza a llegar a la sangre un suministro de ácidos grasos.

RECUADRO 17-2 Coenzima B_{12}: una solución radical a un problema desconcertante

En la reacción de la metilmalonil-CoA mutasa (véase la Fig. 17-12), el grupo -CO-S-CoA en C-2 del propionato original cambia su posición con un átomo de hidrógeno en el C-3 del propionato original (Fig. 1a). El coenzima B_{12} es el cofactor de esta reacción, y también lo es de la mayoría de enzimas que catalizan reacciones de este tipo general (Fig. 1b). Estos procesos dependientes del coenzima B_{12} se cuentan entre las pocas reacciones enzimáticas en biología en las que se produce el intercambio de un grupo alquilo o de un grupo alquilo sustituido (X) con un átomo de hidrógeno de un carbono adyacente, *sin que se produzca intercambio entre el átomo de hidrógeno transferido y el hidrógeno del disolvente*, H_2O. ¿Cómo es posible que el átomo de hidrógeno se traslade de un carbono a otro sin mezclarse con el enorme exceso de átomos de hidrógeno del disolvente?

El coenzima B_{12} es la forma cofactor de la vitamina B_{12}, la única de las vitaminas que contiene, además de una molécula orgánica compleja, un oligoelemento esencial, el cobalto. El complejo **sistema anular de corrina** de la vitamina B_{12} (en color azul en la Fig. 2), en el que se coordina el cobalto (en su forma Co^{3+}), está relacionado químicamente con el sistema anular de porfirina del grupo hemo y de las hemoproteínas (véase la Fig. 5-1). Una quinta posición de coordinación del cobalto está ocupada por el dimetilbencimidazol ribonucleótido (sombreado en amarillo), unido covalentemente por su grupo fosfato en 3' a una de las cadenas laterales del anillo de corrina a través de un aminoisopropanol. La formación de este cofactor complejo se produce en una de las dos únicas reacciones conocidas en las que se escinde trifosfato del ATP (Fig. 3); la otra reacción es la formación de *S*-adenosilmetionina a partir de ATP y metionina (véase la Fig. 18-18).

La vitamina B_{12} se suele aislar en forma de **cianocobalamina**, que contiene un grupo ciano (adquirido durante el proceso de purificación) unido al cobalto en su sexta posición de coordinación. En la **5'-desoxiadenosilcobalamina**, el cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa, el grupo ciano está reemplazado por el grupo **5'-desoxiadenosilo** (en rojo en la Fig. 2), unido covalentemente al cobalto a través del C-5'. La estructura tridimensional del cofactor fue determinada por Dorothy Crowfoot Hodgkin en 1956, mediante cristalografía de rayos X.



Dorothy Crowfoot Hodgkin, 1910-1994
[Fuente: Bettmann/Corbis.]

La clave para comprender el modo en que el coenzima B_{12} cataliza el intercambio de hidrógeno reside en las propiedades del enlace covalente entre el cobalto y el C-5' del grupo desoxiadenosilo (Fig. 2). Este enlace es relativamente débil; la simple iluminación del compuesto con luz visible es capaz de romper este enlace Co-C. (Esta extrema fotolabilidad es probablemente la razón de que las plantas no contengan vitamina B_{12}.) La disociación produce un radical 5'-desoxiadenosilo y la forma Co^{2+} de la vitamina. La función química de la 5'-desoxiadenosilcobalamina es la de generar radicales libres de la manera descrita, con lo que se inicia una serie de transformaciones tales como las ilustradas en la Figura 4, donde se muestra un mecanismo postulado para la reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa y otras transformaciones dependientes del coenzima B_{12}. En este mecanismo propuesto, el átomo de hidrógeno que migra no existe nunca en forma libre ni está por tanto posibilitado para intercambiarse libremente con el hidrógeno de las moléculas de agua circundantes.

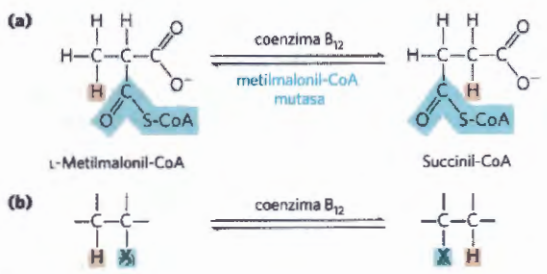


FIGURA 1

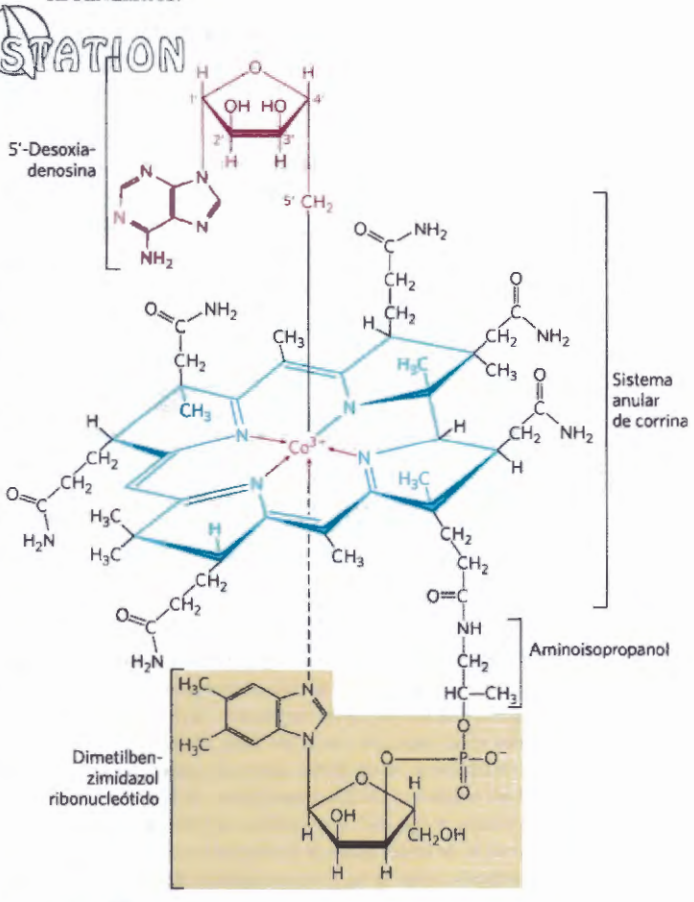


FIGURA 2

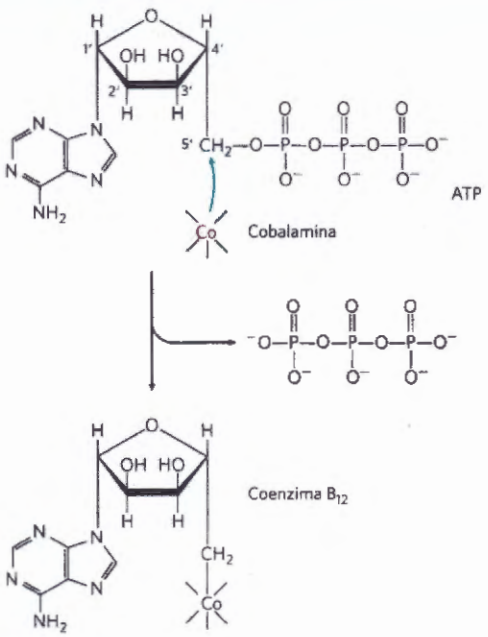
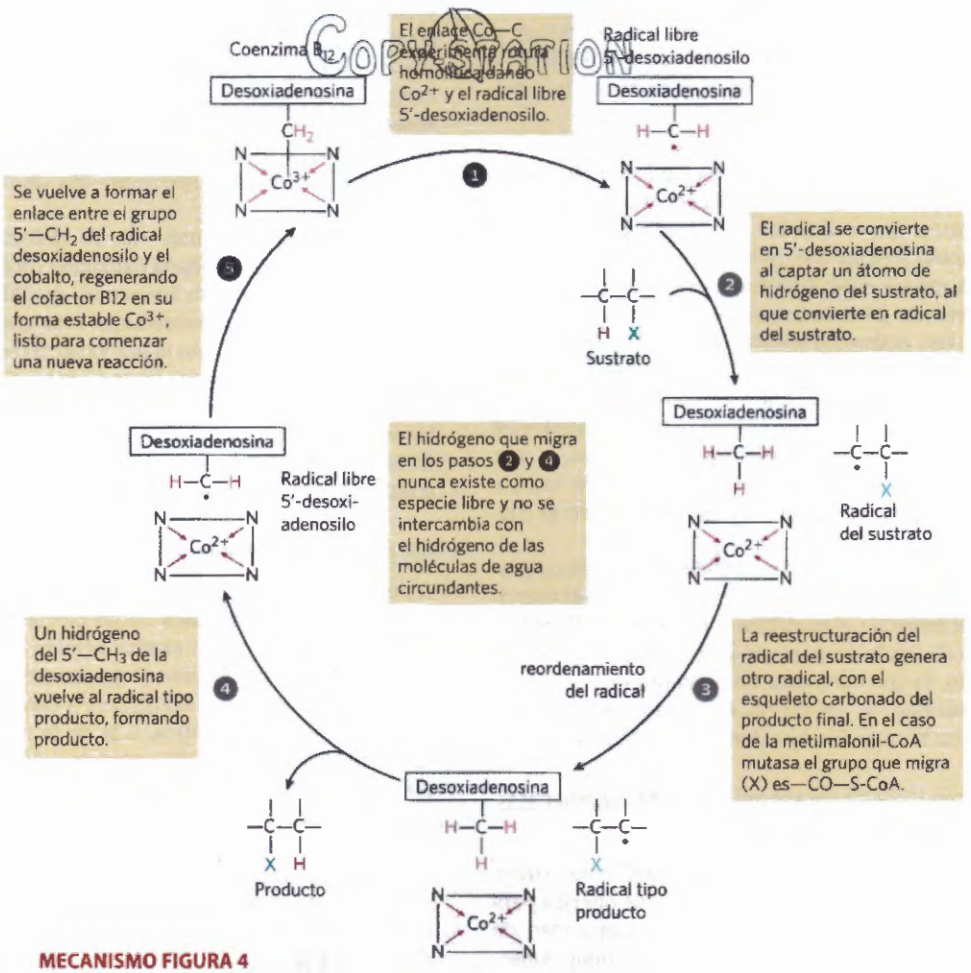


FIGURA 3

La carencia de vitamina B_{12} provoca la aparición de una grave enfermedad. Esta vitamina no se sintetiza ni en plantas ni en animales y sólo pueden sintetizarla unas pocas especies de microorganismos. Las necesidades de la vitamina son muy bajas, de unos 3 μg/día, en las personas sanas. La grave enfermedad denominada **anemia perniciosa** resulta de la incapacidad de absorber de forma eficiente la vitamina B_{12} desde el intestino, donde es sintetizada por las bacterias intestinales o bien obtenida a partir de la ingestión de carne. Los individuos que sufren esta enfermedad no producen una cantidad suficiente de **factor intrínseco**, una glucoproteína esencial para la absorción de la vitamina B_{12}. La patología de la anemia perniciosa incluye una disminución en la producción de eritrocitos, bajos niveles de hemoglobina y un grave y progresivo deterioro del sistema nervioso central. En algunos casos, la administración de grandes dosis de vitamina B_{12} alivia estos síntomas. ■



MECANISMO FIGURA 4

transporte de acil graso-carnitina a la mitocondria (Fig. 17-13) lo que permite que la β-oxidación reponga el suministro de ATP.

La síntesis de proteínas para el catabolismo lipídico es activada por factores de transcripción

Además de los diferentes mecanismos reguladores a corto plazo que modulan la actividad de los enzimas existentes, la regulación de la transcripción puede cambiar el número de moléculas de los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos en una escala de tiempo que va de minutos a horas. La familia **PPAR** de receptores nucleares son factores de transcripción que afectan muchos procesos metabólicos en respuesta a diversos ligandos tipo ácido graso. (Originalmente se reconocieron como *r*eceptores de *p*eroxisomas *a*ctivados por *p*roliferador, pero más tarde se encontró que tenían una función más amplia). El PPARα actúa en el músculo, tejido adiposo e hígado para poner en funcionamiento un conjunto de genes esencial para la oxidación de ácidos grasos entre los que se cuentan el transportador de ácidos grasos, las carnitina aciltransferasas 1 y 2, las acil graso-CoA deshidrogenasas para cadenas acilo cortas, medianas, largas y muy largas y enzimas relacionados. Esta respuesta se desencadena cuando una célula u organismo presenta una demanda superior de energía del catabolismo de las grasas, tal como sucede durante un ayuno entre comidas o en condiciones de inanición prolongada. El glucagón, liberado en respuesta a una baja glucosa sanguínea, puede actuar a través del cAMP y el factor de transcripción CREB para activar ciertos genes que intervienen en el catabolismo lipídico.

Otra situación acompañada de cambios importantes en la expresión de los enzimas de la oxidación de ácidos grasos es la transición del metabolismo fetal al neonatal en el corazón. En el feto los combustibles principales son la glucosa y el lactato, pero en el corazón neonatal, los ácidos grasos constituyen el combustible principal. En el momento de esta transición, se activa el PPARα que, a su vez, activa los genes esenciales para el metabolismo de los ácidos grasos. Tal como veremos en el Capítulo 23, hay otros dos factores de transcripción de la familia PPAR que también juegan papeles cruciales en la adopción de los complementos enzimáticos, y, por consiguiente, las actividades metabólicas, de tejidos específicos en momentos determinados (véase la Fig. 23-43).

Los sitios principales de la oxidación de ácidos grasos, tanto durante el descanso como durante el ejercicio, son el músculo esquelético y el cardíaco. El entrenamiento de fondo aumenta la expresión de PPARα en el músculo, lo que comporta un aumento en los niveles de los enzimas de oxidación de ácidos grasos y un aumento en la capacidad oxidante del músculo.

Defectos genéticos de las acil graso-CoA deshidrogenasas producen enfermedades graves

Los triacilgliceroles almacenados constituyen habitualmente la fuente principal de energía para la contracción muscular por lo que la incapacidad de oxidar ácidos grasos de los triacilgliceroles tiene consecuencias graves para la salud. El defecto genético más frecuente del catabolismo de los ácidos grasos en las poblaciones de los Estados Unidos y del norte de Europa se debe a una mutación en el gen que codifica la **acil-CoA deshidrogenasa de cadena media**, mencionadas anteriormente en este capítulo. Entre los europeos del norte la frecuencia de portadores (individuos con esta mutación recesiva en uno de los dos cromosomas homólogos) es alrededor de 1 en 40 y aproximadamente 1 individuo de cada 10.000 sufre la enfermedad, es decir, tiene dos copias del alelo MCAD mutante con lo que no puede oxidar ácidos grasos de 6 a 12 carbonos. La enfermedad se caracteriza por episodios recurrentes de un síndrome que incluye la acumulación de grasa en el hígado, niveles sanguíneos elevados de ácido octanoico (8:0), baja glucosa sanguínea (hipoglucemia), somnolencia, vómito y coma. Aunque los individuos pueden carecer de síntomas entre episodios, éstos son muy graves; la mortalidad de esta enfermedad es entre el 25% y el 60% en la niñez. Si se detecta el defecto genético poco después del nacimiento, se puede empezar a alimentar al bebé con una dieta baja en grasa y rica en glúcidos. Con la detección temprana y un control cuidadoso de la dieta (entre los que se incluye evitar intervalos largos entre comidas para impedir que el cuerpo movilice sus reservas grasas para la obtención de energía) el pronóstico para estos individuos es bueno.

Para detectar rutinariamente posibles defectos metabólicos de la oxidación de los ácidos grasos en recién nacidos se determinan las concentraciones plasmáticas de acil-carnitina en una pequeña muestra de sangre. Cuando falla la oxidación de ácidos grasos, se acumulan acil-carnitinas en la mitocondria, se transportan al citosol y, a continuación, a la sangre en donde se pueden detectar por espectrometría de masas en tándem

Se han descrito más de 20 defectos genéticos humanos en el transporte u oxidación de ácidos grasos, la mayoría mucho menos frecuentes que el defecto de la MCAD. Una de las enfermedades más graves es la que es debida a la pérdida de la actividad β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga de la proteína trifuncional, TFP. Otras enfermedades son debidas a defectos en las subunidades α o β que afectan a las tres actividades de la TFP que dan lugar a enfermedad cardíaca grave y a músculo esquelético anormal. ■

Los peroxisomas también llevan a cabo la β-oxidación

A pesar de que el sitio principal donde se lleva a cabo la oxidación de ácidos grasos en las células animales es la matriz mitocondrial, en ciertas células otros compartimientos también contienen los enzimas capaces de oxidar ácidos grasos a acetil-CoA a través de una ruta similar, aunque no idéntica, a la de la mitocondria. En las células vegetales el sitio principal de la β oxidación no son las mitocondrias sino los peroxisomas.

En los **peroxisomas**, orgánulos celulares rodeados de membrana presentes en células animales y vegetales, los intermediarios de la β-oxidación de los ácidos grasos son derivados del coenzima A, y el proceso consta de cuatro pasos, al igual que en la β-oxidación mitocondrial **(Fig. 17-14)**: (1) deshidrogenación, (2) adi-

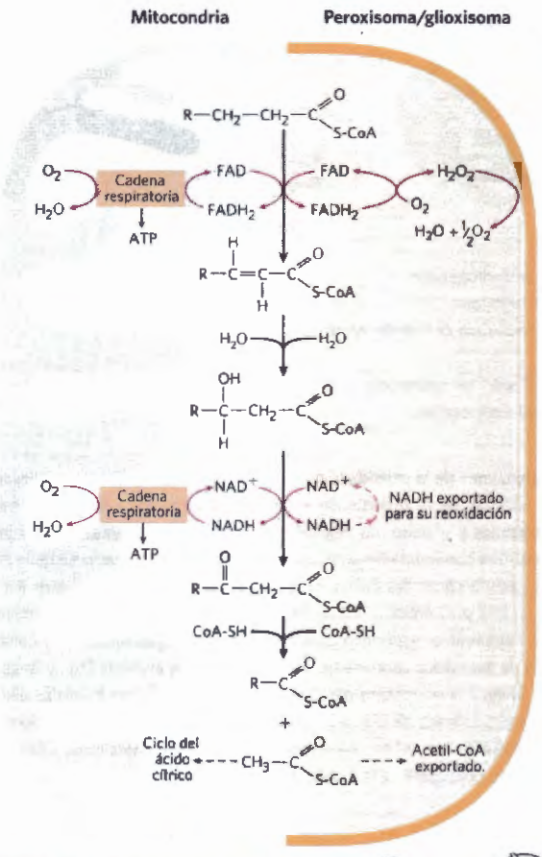


FIGURA 17-14 Comparación de la β-oxidación en mitocondrias y en peroxisomas y glioxisomas. El sistema peroxisómico/glioxisómico difiere del sistema mitocondrial en tres aspectos: (1) el sistema peroxisómico prefiere ácidos grasos de cadena muy larga; (2) en el primer paso oxidativo, los electrones pasan directamente al O_2, generando H_2O_2 y (3) el NADH formado en el segundo paso oxidativo no puede ser reoxidado en el peroxisoma o en el glioxisoma, de forma que los equivalentes de reducción se exportan al citosol, pasando finalmente a la mitocondria. El acetil-CoA producido por los peroxisomas y glioxisomas también se exporta; el acetato de los glioxisomas (orgánulos que se encuentran sólo en las semillas en germinación) se utiliza como precursor biosintético (véase la Fig. 20-55). En las mitocondrias, el acetil-CoA producido sigue oxidándose en el ciclo del ácido cítrico.

ción de agua al doble enlace resultante, (3) oxidación del β-hidroxiacil-CoA a una cetona y (4) rotura tiolítica a cargo del coenzima A. (Reacciones idénticas tienen lugar en los glioxisomas, orgánulos que solo se encuentran en las semillas en germinación). Como se verá a continuación,).

Una diferencia entre las rutas peroxisómica y mitocondrial radica en la química del primer paso (Fig. 17-14). En los peroxisomas, la flavoproteína acil-CoA oxidasa que introduce el doble enlace pasa los electrones directamente al O_2, produciendo H_2O_2. (De ahí el nombre de "peroxisomas"). Este oxidante fuerte y potencialmente peligroso se transforma inmediatamente en H_2O y O_2 por la **catalasa**. Recuerde que en la mitocondria los electrones eliminados en el primer paso de la oxidación pasan a través de la cadena respiratoria hacia el O_2, para producir H_2O, y que este proceso está acompañado de síntesis de ATP. En los peroxisomas, la energía liberada en el primer paso de la oxidación de ácidos grasos no se conserva como ATP, sino que se disipa en forma de calor.

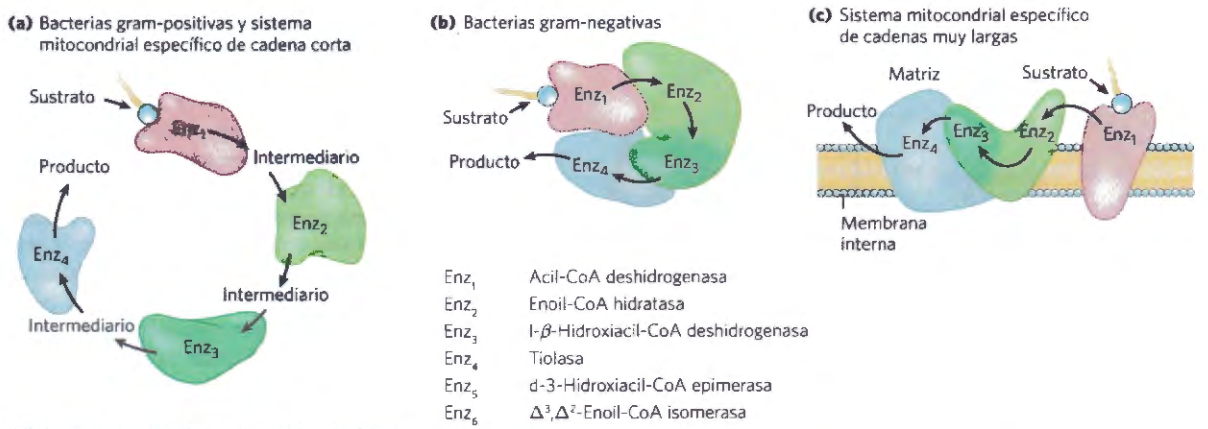
Una segunda diferencia importante entre la β-oxidación mitocondrial y la peroxisómica en los mamíferos reside en la especificidad respecto a los acil graso-CoA; el sistema peroxisómico es mucho más activo sobre los ácidos grasos de cadena muy larga tales como el ácido hexacosanoico (26:0) y sobre ácidos grasos ramificados tales como el ácido fitánico y el ácido pristánico (véase la Fig. 17-17). Estos ácidos grasos menos frecuentes se obtienen en la dieta a partir de productos lácteos, grasa de rumiantes, carne y pescado. Su catabolismo en el peroxisoma requiere varios enzimas auxiliares característicos de este orgánulo. La incapacidad para oxidar estos compuestos es la responsable de varias enfermedades humanas graves. Los individuos con el **síndrome de Zellweger** no pueden fabricar peroxisomas por lo que carecen de todo el metabolismo propio de este orgánulo. En la **adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (XALD),** los peroxisomas no pueden oxidar ácidos grasos de cadena muy larga, parece que debido a la falta de un transportador funcional de estos ácidos grasos en la membrana peroxisómica. Ambos defectos llevan a la acumulación en la sangre de ácidos grasos de cadena muy larga, especialmente el 26:0. La XALD afecta a chicos jóvenes de menos de 10 años produciendo la pérdida de visión, alteraciones del comportamiento y muerte en unos pocos años.

Un nivel elevado de grasa en la dieta de un mamífero produce un aumento en la síntesis de enzimas de la β-oxidación peroxisómica en el hígado. Los peroxisomas del hígado no contienen los enzimas del ciclo del ácido cítrico y no pueden catalizar la oxidación del acetil-CoA a CO_2. En su lugar, los ácidos grasos de cadena larga o ramificados se catabolizan a productos de cadena más corta, tales como el hexanil-CoA y se exportan a las mitocondrias para ser oxidados completamente. Tal como veremos en el Capítulo 20, las semillas de plantas en germinación pueden sintetizar glúcidos y muchos otros metabolitos a partir de acetil-CoA producido en los peroxisomas, utilizando una vía (el ciclo del glioxilato) que no se encuentra en los vertebrados.

Los enzimas de la β-oxidación de diferentes orgánulos han tenido una evolución divergente

A pesar de que las reacciones de la β-oxidación en mitocondrias son esencialmente las mismas que las de los peroxisomas y glioxisomas, los enzimas (isozimas) son significativamente diferentes entre estos dos tipos de orgánulos. Estas diferencias son probablemente el reflejo de una divergencia evolutiva que se produjo muy pronto, durante la separación de las bacterias gram-positivas y gram-negativas (véase la Fig. 1-7).

En las mitocondrias, cada uno de los cuatro enzimas de la β-oxidación que actúan sobre los acil-graso-CoA de cadena corta son proteínas individuales y solubles (tal como se dijo anteriormente), de estructura similar a los enzimas análogos presentes en bacterias gram-positivas **(Fig. 17-15a)**. Las bacterias gram-negativas tienen cuatro actividades en tres subunidades solubles (Fig. 17-15b) y el sistema enzimático de los eucariotas que actúa sobre ácidos grasos de cadena



Enz_1 Acil-CoA deshidrogenasa
Enz_2 Enoil-CoA hidratasa
Enz_3 l-β-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
Enz_4 Tiolasa
Enz_5 d-3-Hidroxiacil-CoA epimerasa
Enz_6 Δ^3,Δ^2-Enoil-CoA isomerasa

FIGURA 17-15 Los enzimas de la β-oxidación. Aquí se muestran las diferentes estructuras de subunidades de los enzimas de la β-oxidación en bacterias gram-positivas y gram-negativas, mitocondrias y peroxisomas y glioxisomas vegetales. **(a)** Los cuatro enzimas de la β oxidación en bacterias gram-positivas son entidades solubles y separadas al igual que el sistema mitocondrial específico para cadena corta. **(b)** En las bacterias gram-negativas, las cuatro actividades enzimáticas residen en tres polipéptidos; Enz_2 y Enz_3 forman parte de una cadena polipeptídica única. **(c)** El sistema mitocondrial específico para cadenas muy largas también se compone de tres polipéptidos, uno de los cuales contiene las actividades de los enzimas Enz_2 y Enz_3; en este caso, el sistema está unido a la membrana mitocondrial interna. **(d)** En los sistemas de la β-oxidación peroxisómico y glioxisómico de plantas, los enzimas Enz, y Enz_4 son polipéptidos separados, mientras que los enzimas Enz_2 y Enz_3, así como dos enzimas auxiliares (Enz_5 y Enz_6), forman parte de una única cadena polipeptídica, la proteína multifuncional MFP.

larga (la proteína trifuncional, TFP) tiene tres actividades enzimáticas en dos subunidades asociadas a membrana (Fig. 17-15c). Sin embargo, los enzimas de la β-oxidación de los peroxisomas y glioxisomas de plantas forman un complejo de proteínas, una de las cuales contiene cuatro actividades enzimáticas en una única cadena polipeptídica (Fig. 17-15d). El primer enzima, la acil-CoA oxidasa, es una cadena polipeptídica sencilla; la **proteína multifuncional (MFP)** contiene la segunda y tercera actividades enzimáticas (enoil-CoA hidratasa e hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) así como dos actividades auxiliares necesarias para la oxidación de ácidos grasos insaturados (d-3-hidroxiacil-CoA epimerasa y Δ^3, Δ^2-enoil-CoA isomerasa); el cuarto enzima, la tiolasa, es un polipétido soluble diferente.

Los enzimas que catalizan esencialmente el inverso de la β-oxidación en la síntesis de ácidos grasos también están organizados de manera diferente en bacterias y eucariotas; en las bacterias, los siete enzimas necesarios para la síntesis de ácidos grasos son polipéptidos separados mientras que en los mamíferos las siete actividades forman parte de una única cadena polipeptídica enorme (véase la Fig. 21-3a). Una ventaja para la célula de tener varios enzimas de la misma ruta codificados en una única cadena polipeptídica es que esto resuelve el problema de regular la síntesis de enzimas que han de interaccionar funcionalmente; la regulación de la expresión de *un* gen asegura la producción del mismo número de sitios activos de todos los enzimas de la vía. Cuando cada actividad enzimática se encuentra en un polipéptido diferente se requiere algún mecanismo que coordine la síntesis de todos los productos génicos. La *desventaja* de tener varias actividades en la misma cadena polipeptídica es que cuanto más larga sea la cadena polipeptídica mayor será la posibilidad de algún error en su síntesis: un solo aminoácido incorrecto en la cadena puede hace que todas las actividades enzimáticas en aquella cadena sean inservibles. La comparación de las estructuras génicas de estas proteínas en muchas especies puede aportar alguna luz sobre las razones para la selección de una u otra estrategia durante la evolución.

Copy-station

En el retículo endoplasmático tiene lugar la ω-oxidación de los ácidos grasos

Aunque la β-oxidación mitocondrial, en la que los enzimas actúan sobre el extremo carboxílico de un ácido graso, es de lejos el destino catabólico más importante para los ácidos grasos en las células animales, en algunas especies, incluidos los vertebrados, existe otra ruta que implica la oxidación del carbono ω (omega), el carbono más distante del grupo carboxílico. Los enzimas exclusivos de la **ω-oxidación** están localizados en el retículo endoplasmático del hígado y riñón, y los sustratos preferidos son los ácidos grasos de 10 ó 12 átomos de carbono. En los mamíferos la ω-oxidación es normalmente una ruta minoritaria para la degradación de ácidos grasos, pero cuando la β-oxidación es defectuosa (debido a una mutación o a la deficiencia de carnitina, por ejemplo) se hace más importante.

El primer paso introduce un grupo hidroxilo en el carbono ω **(Fig. 17-16)**. El oxígeno para este grupo proviene del oxígeno molecular (O_2) a través de una reacción compleja en la que interviene el citocromo P450 y el dador de electrones NADPH. Las reacciones de este tipo están catalizadas por **oxidasas de función mixta**, descritas en el Recuadro 21-1. Otros dos enzimas

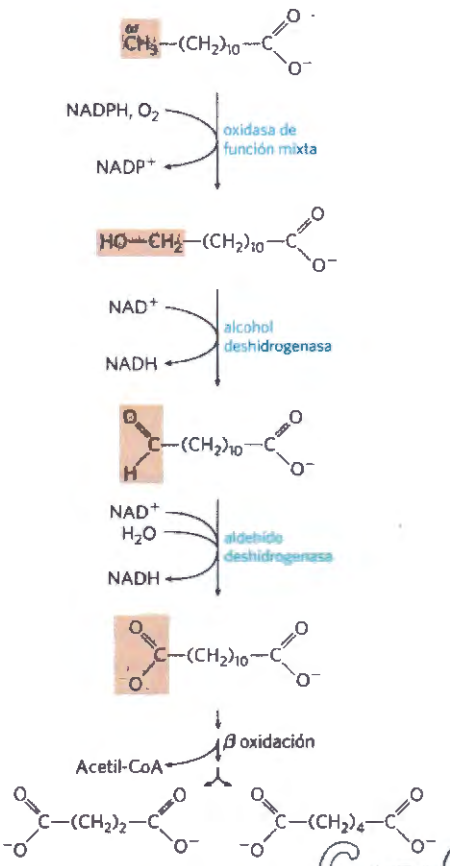


FIGURA 17-16 ω-Oxidación de ácidos grasos en el retículo endoplasmático. Esta alternativa a la β-oxidación se inicia con la oxidación del carbono más alejado del carbono α -el carbono ω (omega). El sustrato es normalmente un ácido graso de cadena media; aquí se muestra el ácido láurico (laurato). Esta ruta no es, generalmente, la ruta principal del catabolismo oxidativo de los ácidos grasos.

actúan a continuación sobre el carbono ω: la **alcohol deshidrogenasa** oxida el grupo hidroxilo a un aldehído, y la **aldehído deshidrogenasa** oxida el grupo aldehído a un ácido carboxílico, produciendo un ácido graso con un grupo carboxílico en cada extremo. En este punto, cualquiera de los dos extremos puede unirse al coenzima A, y la molécula puede entrar en la mitocondria y experimentar la β-oxidación por la ruta normal, liberando acetil-CoA y ácidos dicarboxílicos de 12, 10, 8, 6 y 4 carbonos. El ácido de cuatro átomos de carbono (ácido succínico) puede entrar en el ciclo del ácido cítrico y experimentar oxidación como combustible.

El ácido fitánico experimenta α oxidación en los peroxisomas

El ácido fitánico, un ácido graso de cadena larga con ramificaciones metilo, proviene de la cadena lateral de fitol de la clorofila (véase las Fig. 20-8). La presencia de un grupo metilo sobre el carbono β de este ácido graso impide la formación de un intermediario β-ceto con lo que la β oxidación es imposible. Las personas obtienen ácido fitánico con la dieta, principalmente con los productos lácteos y con las grasas de animales rumiantes; los microorganismos del rumen de estos animales producen ácido fitánico al digerir la clorofila vegetal. La dieta occidental típica incluye de 50 a 100 mg de ácido fitánico al día.

El ácido fitánico se metaboliza en los peroxisomas mediante **α-oxidación**, en la que un carbono es eliminado desde el extremo carboxilo del ácido **(Fig. 17-17)**. El fitanil-CoA se hidroxila en su carbono α, en una reacción en la que interviene el oxígeno molecular. El producto se descarboxila formando un aldehído con un carbono menos y a continuación se oxida al correspondiente ácido carboxílico que ahora no tiene sustituyente en el carbono β. La posterior β-oxidación produce acetil-CoA y, posteriormente, propionil-CoA en sucesivos ciclos oxidativos. La **enfermedad de Refsum,** resultado de un defecto genético en la fitanil-CoA hidroxilasa, conduce a la acumulación de concentraciones muy elevadas de ácido fitánico en la sangre causando (por mecanismos desconocidos) déficits neurológicos graves, entre ellos ceguera y sordera.

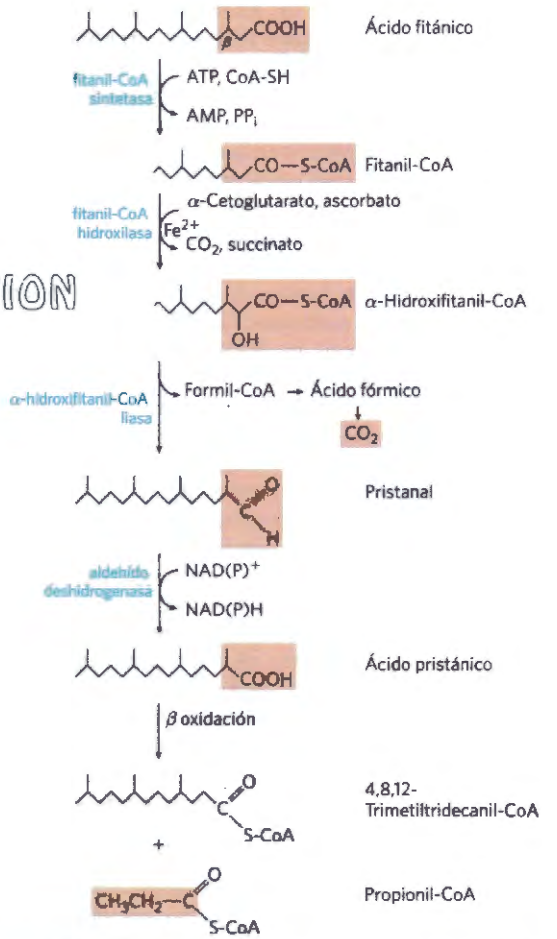


FIGURA 17-17 α-Oxidación de un ácido graso de cadena ramificada (ácido fitánico) en peroxisomas. El ácido fitánico tiene un carbono β sustituido con un metilo por lo que no puede experimentar β-oxidación. La acción combinada de los enzimas que se muestran aquí eliminan el carbono carboxílico del ácido fitánico, lo que da ácido pristánico, en el que el carbono β no está sustituido, lo que permite la β oxidación. Observe que la β-oxidación del ácido pristánico libera propionil-CoA y no acetil-CoA. El propionil-CoA prosigue su catabolismo tal como se muestra en la Figura 17-12. (Los detalles de la reacción que produce pristanal son aún objeto de controversia).

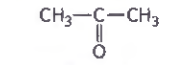
COPY-STATION

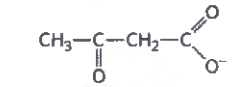
RESUMEN 17.2 Oxidación de ácidos grasos

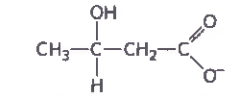
- En la primera fase de la β-oxidación, cuatro reacciones eliminan cada una de las unidades de acetil-CoA del extremo carboxilo de un acil graso-CoA saturado: (1) deshidrogenación de los carbonos α y β (C-2 y C-3) por acil-CoA deshidrogenasas unidas a FAD, (2) hidratación del doble enlace *trans*-Δ^2 resultante por la enoil-CoA hidratasa, (3) deshidrogenación del l-β-hidroxiacil-CoA resultante por parte de la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa unida a NAD y (4) rotura por parte de la tiolasa y en presencia de CoA del β-cetoacil-CoA resultante, para formar acetil-CoA y un acil graso-CoA acortado en dos carbonos. El acil graso-CoA acortado entra entonces de nuevo en la secuencia.
- En la segunda fase de la oxidación de ácidos grasos el acetil-CoA se oxida a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Una parte importante del rendimiento teórico de energía libre de la oxidación de ácidos grasos se recupera en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la fase final de la ruta oxidativa.
- El malonil-CoA, un intermediario temprano de la síntesis de ácidos grasos inhibe la carnitina aciltransferasa 1, impidiendo la entrada de ácidos grasos en la mitocondria. Esto bloquea la degradación de ácidos grasos cuando se produce la síntesis de los mismos.
- Defectos genéticos en la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media tienen como resultado una grave enfermedad en humanos. Lo mismo ocurre con mutaciones en otros componentes del sistema de la β-oxidación.
- La oxidación de ácidos grasos insaturados requiere dos enzimas adicionales: la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa. Los ácidos grasos de número impar de carbonos se oxidan mediante la ruta de la β-oxidación dando acetil-CoA y una molécula de propionil-CoA. El propionil-CoA se carboxila a metilmalonil-CoA, que se isomeriza a succinil-CoA en una reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa, un enzima que requiere coenzima B_{12}.
- Los peroxisomas de plantas y animales, y los glioxisomas de las plantas, llevan a cabo la β-oxidación en cuatro pasos similares a los de la ruta mitocondrial en los animales. El primer paso de oxidación, sin embargo, transfiere los electrones directamente al O_2 generando H_2O_2. Los peroxisomas de los tejidos animales están especializados en la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga y ácidos grasos ramificados.
- La reacciones de la ω-oxidación, que tienen lugar en el retículo endoplasmático, producen intermediarios acil graso dicarboxílicos que pueden experimentar β-oxidación en cualquier extremo, dando ácidos dicarboxílicos cortos tales como el succinato.
- Las reacciones de la α oxidación convierten ácidos grasos de cadena ramificada como, por ejemplo, el ácido fitánico, a productos que pueden experimentar β-oxidación, dando acetil-CoA y propionil-CoA.

17.3 Cuerpos cetónicos

En los seres humanos y en la mayoría de los mamíferos, el acetil-CoA formado en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos puede entrar en el ciclo del ácido cítrico (fase 2 de la Fig. 17-7) o puede ser convertido en los "cuerpos cetónicos" **acetona**, **acetoacetato** y **D-β-hidroxibutirato**, para ser exportados a otros tejidos. (El término "cuerpos" proviene de un malentendido histórico; los compuestos son solubles en la sangre y en la orina, no son particulados, y no todos ellos son cetonas).


Acetona


Acetoacetato


D-β-Hidroxibutirato

La acetona, producida en menores cantidades que los demás cuerpos cetónicos, se exhala. El acetoacetato y el d-β-hidroxibutirato son transportados por la sangre a tejidos diferentes al hígado (los tejidos extrahepáticos), donde se convierten en acetil-CoA y se oxidan a través del ciclo del ácido cítrico proporcionando gran parte de la energía necesaria para tejidos tales como los músculos esquelético y cardíaco y la corteza suprarrenal. El cerebro, que utiliza preferentemente glucosa como combustible, puede adaptarse al uso de acetoacetato o d-β-hidroxibutirato en condiciones de inanición, cuando no es posible disponer de glucosa. En esta situación, el cerebro no puede utilizar ácidos grasos como combustible debido a que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica. La producción y exportación de cuerpos cetónicos desde el hígado a los tejidos extrahepáticos permite la oxidación continuada de ácidos grasos en el hígado cuando el acetil-CoA no está siendo oxidado en el ciclo del ácido cítrico.

Copy Station

Los cuerpos cetónicos formados en el hígado se exportan a otros órganos como combustible

El primer paso de la formación de acetoacetato en el hígado **(Fig. 17-18)** es la condensación enzimática de dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por la tiolasa; esta reacción es simplemente la inversa del último paso de la β-oxidación. A continuación, el acetoacetil-CoA se condensa con otra molécula de acetil-CoA para formar el **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA),** que se rompe formando acetoacetato libre y acetil-CoA. El acetoacetato es reducido reversiblemente a d-β-hidroxibutirato por acción del enzima mitocondrial d-β-hidroxibutirato deshidrogenasa. Este enzima es específico para el estereoisómero d; no puede actuar sobre los l-β-hidroxiacil-CoA y es distinta de la l-β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de la ruta de la β-oxidación. La diferencia en la esteroespecificidad de los dos enzimas que utilizan β-hidroxiacil-CoA como sustratos en la degradación y síntesis de ácidos grasos significa que la célula puede mantener fondos separados de β-hidroxiacil-CoA, previamente marcados ya sea para la degradación o para la síntesis.

En las personas sanas, la acetona se forma en muy pequeñas cantidades a partir del acetoacetato, que es fácilmente descarboxilado ya sea espontá-

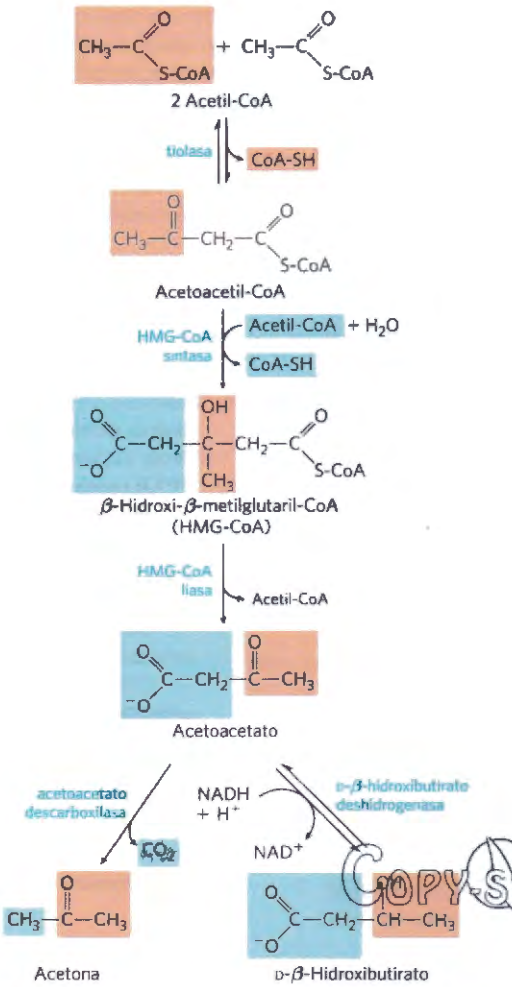


FIGURA 17-18 Formación de cuerpos cetónicos a partir de acetil-CoA. Los individuos sanos y bien alimentados producen cuerpos cetónicos a una velocidad relativamente baja. Cuando se produce una acumulación de acetil-CoA (como, por ejemplo, en la inanición o la diabetes sin tratar), la tiolasa cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA, el compuesto precursor de los tres cuerpos cetónicos. Las reacciones de formación de cuerpos cetónicos se producen en la matriz de las mitocondrias del hígado. El compuesto de seis átomos de carbono β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) es también un intermediario de la biosíntesis de esteroles, pero el enzima que forma HMG-CoA en esa ruta es citosólico. La HMG-CoA liasa sólo está presente en la matriz mitocondrial.

neamente, o por acción de la **acetoacetato descarboxilasa** (Fig. 17-18). Los diabéticos no sometidos a tratamiento producen grandes cantidades de acetoacetato y por ello su sangre contiene cantidades significativas de acetona, que es tóxica. La acetona es volátil y confiere un olor característico al aliento, que a veces es de utilidad en el diagnóstico de la diabetes. ■

En los tejidos extrahepáticos, el D-β-hidroxibutirato se oxida a acetoacetato por acción de la D-β-hidroxibutirato deshidrogenasa **(Fig. 17-19)**. El acetoacetato se activa formando su éster de coenzima A por transferencia del CoA del succinil-CoA, un intermediario del ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 16-7), en una reacción catalizada por la, también llamada tioforasa. A continuación, y por acción de la tiolasa, el acetoacetil-CoA se rompe dando dos moléculas de acetil-CoA que entran en el ciclo del ácido cítrico. De este modo los cuerpos cetónicos se utilizan como combustible en todos los tejidos excepto el hígado, que carece de β-cetoacil-CoA transferasa. El hígado es, por tanto, un productor de cuerpos cetónicos para los demás tejidos, pero no es consumidor de los mismos.

La producción y exportación de cuerpos cetónicos por el hígado permite la oxidación continuada de ácidos grasos con sólo una oxidación mínima del acetil-CoA. Cuando se extraen intermediarios del ciclo del ácido cítrico para la síntesis de glucosa por la gluconeogénesis, por ejemplo, la oxidación de intermediarios del ciclo se hace más lenta, lo mismo que la oxidación del acetil-CoA. Además, el hígado sólo contiene una cantidad limitada de coenzima A y cuando la mayor parte se encuentra ligado en forma de acetil-CoA la β-oxidación se hace más lenta por falta de coenzima libre. La producción y exportación de cuerpos cetónicos libera coenzima A lo que permite la oxidación continuada de ácidos grasos.

Durante la diabetes y en situaciones de inanición se da una sobreproducción de cuerpos cetónicos

La inanición y la diabetes mellitus no tratada conducen a una sobreproducción de cuerpos cetónicos que lleva asociados diversos efectos adversos sobre la salud. Durante la inanición, la gluconeogénesis consume los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, desviando el acetil-CoA a la producción de cuerpos cetónicos **(Fig. 17-20)**. En la diabetes sin tratar, cuando el nivel de insulina es insuficiente, los tejidos extrahepáticos no pueden captar glucosa de la sangre de manera eficiente para utilizarla como combustible o para convertirla en

COPY-STATION

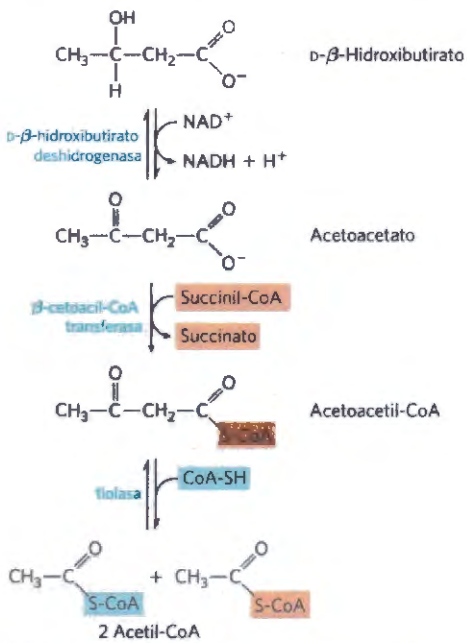


FIGURA 17-19 El D-β-hidroxibutirato como combustible. El D-β-hidroxibutirato sintetizado en el hígado pasa a la sangre y a través de ella a otros tejidos, donde se convierte en tres pasos en acetil-CoA. En primer lugar se oxida a acetoacetato, que es activado por el coenzima A donado por el succinil-CoA; a continuación, es escindido por la tiolasa. El acetil-CoA así formado se utiliza para la producción de energía.

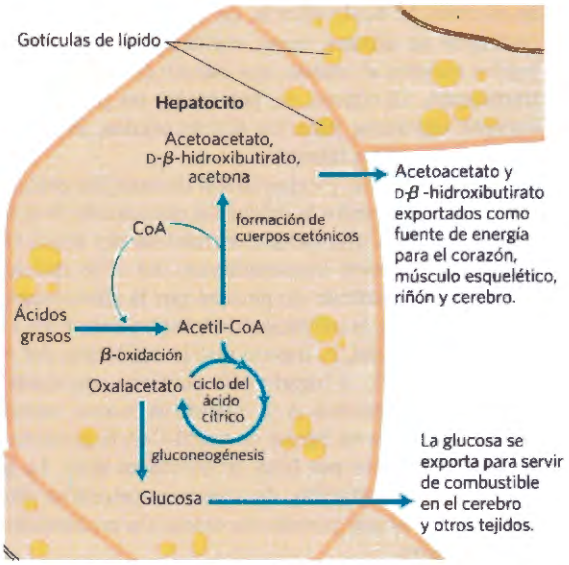


FIGURA 17-20 Formación de cuerpos cetónicos y exportación de los mismos desde el hígado. En situaciones donde se da un incremento de la gluconeogénesis (diabetes no tratada, ingestión de alimentos muy reducida), el ciclo del ácido cítrico se hace más lento (por drenaje del oxalacetato) y aumenta el ritmo de conversión del acetil-CoA en acetoacetato. El coenzima A liberado permite la β-oxidación continua de ácidos grasos.

grasas. En estas condiciones, disminuye la concentración de malonil-CoA (el producto de partida para la síntesis de ácidos grasos; véase la Fig. 21-1), desaparece la inhibición de la carnitina aciltransferasa 1 y los ácidos grasos entran en la mitocondria para ser degradados a acetil-CoA, el cual no puede pasar a través del ciclo del ácido cítrico puesto que los intermediarios del ciclo han sido eliminados para su uso como sustratos en la gluconeogénesis. La acumulación resultante de acetil-CoA acelera la formación de cuerpos cetónicos y su liberación a la sangre hasta superar la capacidad de los tejidos extrahepáticos para oxidarlos. El aumento en los niveles sanguíneos de acetoacetato y de d-β-hidroxibutirato hace descender el pH sanguíneo, originando el estado conocido como **acidosis**. Una acidosis extrema puede conducir al coma y en algunos casos a la muerte. Los cuerpos cetónicos en la sangre y orina de diabéticos sin tratar pueden llegar a alcanzar niveles extraordinarios – una concentración sanguínea de 90 mg/100 mL (en comparación con el valor normal de <3 mg/100mL) y una excreción urinaria de 5.000 mg/24 hr (en comparación con una velocidad normal de ≤ 125 mg/24 hr). Este estado se conoce como **cetosis** o. cuando se combina con la acidosis, **cetoacidosis**.

Los individuos sujetos a dietas muy bajas en calorías, que utilizan las grasas almacenadas en el tejido adiposo como fuente principal de energía, también tienen unos niveles superiores de cuerpos cetónicos en sangre y orina. Estas concentraciones deben controlarse para evitar los peligros de la cetoacidosis. ■

RESUMEN 17.3 Cuerpos cetónicos

■ Los cuerpos cetónicos -acetona, acetoacetato y d-β-hidroxibutirato se forman en el hígado cuando los ácidos grasos son el combustible principal que mantienen el metabolismo del cuerpo completo. Acetoacetato y d-β-hidroxibutirato sirven como moléculas de combustible en tejidos extrahepáticos, incluido el cerebro, a través de la oxidación a acetil-CoA y entrada en el ciclo del ácido cítrico.

■ La sobreproducción de cuerpos cetónicos en la diabetes incontrolada o en la reducción drástica de la ingestión de calorías puede provocar acidosis o cetosis o ambas (cetoacidosis).

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

β-oxidación 647
quilomicrón 649
apolipoproteína 649
lipoproteína 649
perilipina 649
ácidos grasos libres 649
albúmina sérica 649
lanzadera de la carnitina 650
carnitina aciltransferasa 1 651
transportador de acil-carnitina/carnitina 651
carnitina aciltransferasa 2 651
proteína trifuncional (TFP) 654
metilmalonil-CoA mutasa 659
coenzima B_{12} 659
malonil-CoA 659
anemia perniciosa 661
factor intrínseco 661
PPAR (receptor del peroxisoma activado por proliferador) 662
acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) 662
proteína multifuncional (MFP) 664
ω-oxidación 664
oxidasas de función mixta 664
α-oxidación 665
acidosis 668
cetosis 668
cetoacidosis 668

Problemas

1. Energía de los triacilgliceroles Tomando como referencia la cantidad por carbono: ¿dónde reside la mayor cantidad de energía metabólica disponible en los triacilgliceroles: en la parte ácido graso o en la parte glicerol? Indique de qué manera el conocimiento de la estructura química de los triacilgliceroles proporciona la respuesta.

2. Reservas de combustible en el tejido adiposo Los triacilgliceroles, con sus ácidos grasos de tipo hidrocarburo, poseen el mayor contenido en energía entre los principales nutrientes.

(a) Si el 15% de la masa corporal de un adulto de 70,0 kg de peso consiste en triacilgliceroles, calcule su reserva total de combustible disponible en kilojoules y en kilocalorías. Recuerde que 1,00 kcal = 4,18 kJ.

(b) Si las necesidades basales de energía son de aproximadamente 8.400 kJ/día (2.000 kcal/día), ¿durante cuánto tiempo podría sobrevivir esta persona si la oxidación de los ácidos grasos almacenados como triacilgliceroles fuera su única fuente de energía?

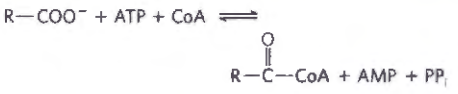
(c) ¿Cuál sería la pérdida de peso en libras por día en tales condiciones de inanición (1 lb = 0,454 kg)?

3. Reacciones comunes del ciclo de la oxidación de ácidos grasos y del ciclo del ácido cítrico Las células utilizan a menudo el mismo tipo de reacciones enzimáticas para llevar a cabo conversiones metabólicas análogas. Por ejemplo, los pasos de la oxidación del piruvato a acetil-CoA y del α-cetoglu-

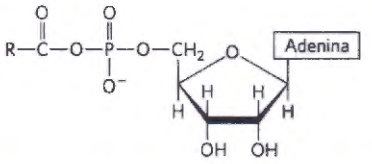
tarato a succinil-CoA, son muy parecidos a pesar de ser catalizados por enzimas diferentes. La primera fase de la oxidación de los ácidos grasos sigue una secuencia de reacciones que recuerda en gran medida otra que se da en el ciclo del ácido cítrico. Muestre, con la ayuda de ecuaciones, las secuencias de reacción análogas en ambas rutas.

4. β-Oxidación: ¿Cuántos ciclos? ¿Cuántos ciclos de β-oxidación se requieren para la oxidación completa del ácido oleico, 18:1(Δ^9) activado?

5. Química de la reacción de la acil-CoA sintetasa Los ácidos grasos se convierten en sus ésteres de coenzima A mediante una reacción reversible catalizada por la acil-CoA sintetasa:



(a) Se ha identificado el intermedio unido al enzima en esta reacción como el anhídrido mixto entre el ácido graso y la adenosina monofosfato (AMP), acil-AMP:



Escriba dos ecuaciones que correspondan a los dos pasos de la reacción catalizada por la acil-CoA sintetasa.

(b) La reacción de la acil-CCoA sintetasa descrita es fácilmente reversible, con una constante de equilibrio cercana a 1. ¿De qué modo puede favorecerse la formación del acil graso-CoA en esta reacción?

6. Intermediarios en la oxidación del ácido oleico ¿Qué estructura tiene el grupo acilo graso parcialmente oxidado que se forma cuando el ácido oleico, 18:1(Δ^9) ha experimentado tres ciclos de β-oxidación? ¿Cuáles son los dos pasos siguientes en la oxidación continuada de este intermediario?

7. β-Oxidación de un ácido graso de cadena impar ¿Cuáles son los productos directos de la β-oxidación de un ácido graso de 11 carbonos totalmente saturado y de cadena lineal?

8. Oxidación del palmitato tritiado Se añade palmitato marcado uniformemente con tritio (^3H), con una actividad específica de 2,48 x 10^8 cuentas por minuto (cpm) por micromol de palmitato, a una preparación mitocondrial que lo oxida a acetil-CoA. Se aísla el acetil-CoA y se hidroliza a acetato. La actividad específica del acetato aislado es de 1,00 x 10^7 cpm/μmol. ¿Es este resultado coherente con la ruta de la β-oxidación? Explíquelo. ¿Cuál es el destino final del tritio eliminado?

9. Compartimentación de la β-oxidación El palmitato libre se activa a su forma de derivado del coenzima A (palmitil-CoA) en el citosol, antes de poder ser oxidado en la mitocondria. Si se añade palmitato y [^{14}C] coenzima A a un homogenado de hígado, el palmitil-CoA aislado de la fracción citosólica es radiactivo, pero el aislado de la fracción mitocondrial no lo es. Explique la razón.

10. Bioquímica comparativa: Rutas de generación de energía en las aves Una indicación de la importancia relativa de las diversas rutas productoras de ATP es la $V_{máx}$ de ciertos enzimas de estas rutas. A continuación se muestra la $V_{máx}$ de varios enzimas de los músculos pectorales (músculos del pecho utilizados para el vuelo) de la paloma y del faisán.

	$V_{máx}$ (μmol sustrato/min/g tejido)	
Enzima	**Paloma**	**Faisán**
Hexoquinasa	3,0	2,3
Glucógeno fosforilasa	18,0	120,0
Fosfofructoquinasa-1	24,0	143,0
Citrato sintasa	100,0	15,0
Triacilglicerol lipasa	0,07	0,01

(a) Discuta la importancia relativa del metabolismo del glucógeno y el metabolismo de las grasas en la generación de ATP en los músculos pectorales de estas aves.

(b) Compare el consumo de oxígeno de las dos aves.

(c) A juzgar por los datos de la tabla, ¿qué ave es la que vuela grandes distancias? Justifique su respuesta.

(d) ¿Por qué se seleccionaron estos enzimas en particular para la comparación? ¿Serían las actividades de la triosa fosfato isomerasa y la malato deshidrogenasa bases igualmente buenas para la comparación? Explíquelo.

11. Carnitina aciltransferasa mutante ¿Qué cambios en el patrón del metabolismo se producirían como consecuencia de una mutación en la carnitina aciltransferasa 1 de músculo en la que la proteína mutante hubiese perdido su afinidad hacia el malonil-CoA pero no su actividad catalítica?



12. Efecto de la deficiencia de carnitina Un paciente desarrolló una enfermedad caracterizada por una progresiva debilidad muscular y por dolorosos calambres musculares. Los síntomas se agravaron con el ayuno, el ejercicio y una dieta rica en grasas. El homogenado de una muestra de músculo esquelético del paciente oxidaba el oleato añadido más lentamente que lo que lo hacían homogenados control de muestras de músculo de individuos sanos. Cuando se añadió carnitina al homogenado de músculo del paciente, la velocidad de oxidación de oleato medida igualó a la de los homogenados control. Al paciente se le diagnosticó una deficiencia de carnitina.

(a) ¿Por qué la adición de carnitina incrementaba la velocidad de oxidación del oleato en el homogenado de músculo del paciente?

(b) ¿Por qué se agravaban los síntomas del paciente por el ayuno, el ejercicio y la dieta rica en grasas?

(c) Sugiera dos posibles razones que expliquen la deficiencia de carnitina en el músculo en este paciente.

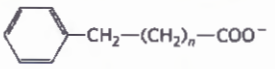
13. Los ácidos grasos como fuente de agua En contra de lo que dice la leyenda, los camellos no almacenan agua en sus jorobas, que consisten, de hecho, en grandes depósitos de grasa. ¿De qué modo pueden utilizarse estos depósitos de grasa como fuente de agua? Calcule la cantidad de agua (en litros) que puede ser producida por un camello a partir de 1,0 kg de grasa. Considere, para simplificar el problema, que la grasa consiste únicamente en tripalmitilglicerol.

14. El petróleo como fuente de nutrientes microbianos Algunos microorganismos de los géneros *Nocardia* y *Pseudomonas* pueden crecer en ambientes en los que los hidrocarburos son la única fuente nutritiva. Estas bacterias oxidan los hidrocarburos alifáticos de cadena lineal, como por ejemplo el octano, a sus correspondientes ácidos carboxílicos:



¿Cómo se podrían utilizar estas bacterias para eliminar mareas negras? ¿Indique algunos de los factores limitantes de la eficiencia de este proceso?

15. Metabolismo de un ácido graso fenilado de cadena lineal Se aisló un metabolito cristalino de la orina de un conejo al que se le había suministrado un ácido graso de cadena lineal que contenía un grupo fenilo terminal:



Una muestra de 302 mg del metabolito en solución acuosa se neutralizó completamente por adición de 22,2 mL de NaOH 0,100 m.

(a) Indique la masa molecular y estructura probables del metabolito.

(b) La cadena lineal de ácido graso ¿contenía un número par o impar de grupos metileno (—CH_2—) (es decir, es n par o impar)? Explique la respuesta.

16. Oxidación de ácidos grasos en diabéticos no controlados Cuando el acetil-CoA producido durante la β-oxidación en el hígado excede la capacidad del ciclo del ácido cítrico, el exceso de acetil-CoA forma los cuerpos cetónicos acetona, acetoacetato y d-β-hidroxibutirato. Esta situación se da en casos de diabetes grave no controlada: como los tejidos no pueden utilizar glucosa, oxidan en cambio grandes cantidades de ácidos grasos. A pesar de que el acetil-CoA no es tóxico, la mitocondria debe desviar el acetil-CoA hacia los cuerpos cetónicos. ¿Qué problema surgiría si el acetil-CoA no se convirtiera en cuerpos cetónicos? ¿De qué manera se soluciona el problema gracias a esta desviación?

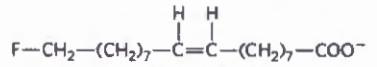
17. Consecuencias de una dieta rica en grasas y sin glúcidos Suponga que tuviera que subsistir con una dieta consistente en grasa de ballena y de foca, sin prácticamente ningún aporte de glúcidos.

(a) ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?

(b) Si la dieta no tuviera glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar? Explíquelo.

18. Ácidos grasos de número par e impar en la dieta En un experimento de laboratorio, se alimentaron dos grupos de ratas con dos ácidos grasos diferentes como única fuente de carbono durante un mes. Al primer grupo se le dio ácido heptanoico (7:0) y al segundo ácido octanoico (8:0). Después del experimento, se observó una diferencia notable entre los dos grupos. Los del primer grupo estaban sanos y habían ganado peso, mientras que los del segundo grupo estaban débiles y habían perdido peso como resultado de pérdida de masa muscular. ¿Cuál es la base bioquímica de esta diferencia?

19. Consecuencias metabólicas de la ingestión de ω-fluorooleato El arbusto *Dichapetalum toxicarium*, que crece en Sierra Leone, produce ω-fluorooleato, que es muy tóxico para los animales de sangre caliente.



ω-Fluorooleato

Esta sustancia se ha utilizado como veneno para flechas, y el fruto de la planta pulverizado se utiliza a veces como raticida (de ahí el nombre común de la planta, raticida) ¿Por qué es tan tóxica esta sustancia? (Sugerencia: revise el Capítulo 16, Problema 22).

20. Acetil-CoA carboxilasa mutante ¿Qué consecuencias tendría para el metabolismo de las grasas una mutación en la acetil-CoA carboxilasa que reemplazase el residuo Ser fosforilado normalmente por la AMPK por un residuo Ala? ¿Qué pasaría si el mismo residuo Ser fuese reemplazado por Asp? (Pista: Vea la Fig. 17-13).

21. Efecto de un inhibidor de la PDE sobre los adipocitos ¿Cómo se vería afectada la respuesta de los adipocitos a la adrenalina al añadir un inhibidor de la cAMP fosfodiesterasa (PDE)? (Pista: Véase la Fig. 12-4).

22. Papel del FAD como aceptor de electrones La acil-CoA deshidrogenasa utiliza FAD unido al enzima como grupo prostético para la deshidrogenación de los carbonos α y β del acil graso-CoA. ¿Cuál es la ventaja de utilizar FAD como aceptor de electrones en lugar del NAD+? Explíquelo en términos del potencial de reducción estándar para las semirreacciones Enz-FAD/$FADH_2$ (E'° = - 0,219 V) y NAD+/NADH (E'° = - 0,320 V).

23. β-oxidación del ácido araquídico ¿Cuántas vueltas del ciclo de oxidación de ácidos grasos se necesitan para oxidar completamente el ácido araquídico (véase la Tabla 10-1) a acetil-CoA?

24. Destino del propionato marcado Si se añade [3-^{14}C] propionato (con ^{14}C en el grupo metilo) a un homogenado de hígado, se produce rápidamente oxalacetato marcado con ^{14}C. Dibuje la ruta por la que el propionato se transforma en oxalacetato e indique la localización del ^{14}C en el oxalacetato.

25. Metabolismo del ácido fitánico Cuando se alimenta un ratón con ácido fitánico marcado de manera uniforme con ^{14}C, se puede detectar actividad en el malato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, al cabo de pocos minutos. Diseñe una ruta metabólica que pueda explicar esta observación. ¿Qué átomo de carbono del malato contendría la marca de ^{14}C?

Copy-Station

26. Origen de las moléculas de H_2O producidas durante la β-oxidación La oxidación completa del palmitil-CoA a dióxido de carbono y agua se representa por la ecuación global

$$\text{Palmitil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108\ \text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 16CO_2 + 108\text{ATP} + 23H_2O$$

Se produce también agua en la reacción

$$\text{ADP} + P_i \longrightarrow \text{ATP} + H_2O$$

¿Por qué no se incluye esta agua como un producto neto de la reacción? ¿Por qué?

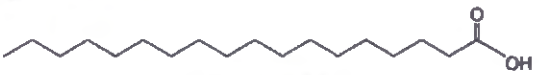
27. Importancia biológica del cobalto El ganado vacuno, los ciervos, las ovejas y otros rumiantes, producen grandes cantidades de propionato en el rumen a través de la fermentación bacteriana de la materia vegetal ingerida. El propionato es la fuente principal de glucosa para estos animales a través de la ruta propionato à oxalacetato à glucosa. En algunas regiones del mundo, y en particular en Australia, los rumiantes muestran a veces síntomas de anemia con pérdidas concomitantes de apetito y retrasos en el crecimiento, como resultado de la incapacidad del animal para transformar propionato en oxalacetato. Este estado es debido a una deficiencia de cobalto que tiene su origen en los muy bajos niveles de cobalto existentes en el suelo y, por lo tanto, en la materia vegetal. Explíquelo.

28. Pérdida de grasa durante la hibernación Los osos gastan alrededor de 25 x 10^6 J/día durante los períodos de hibernación, que pueden durar hasta siete meses. La energía

que necesitan para mantener la vida se obtiene de la oxidación de ácidos grasos. ¿Qué pérdida de peso (en kilogramos) ha tenido lugar tras siete meses? ¿Cómo puede minimizarse la cetosis durante la hibernación? (Suponga que la oxidación de grasa da lugar a 38 kJ/g.)

Problema de análisis de datos

29. β-Oxidación de grasas trans Las grasas insaturadas con dobles enlaces trans se conocen habitualmente como "grasas trans". Ha habido un gran debate sobre los efectos de las grasas trans de la dieta sobre la salud. En sus investigaciones sobre los efectos del metabolismo de los ácidos grasos trans sobre la salud Yu y colaboradores (2004) demostraron que un ácido grasos trans modelo se trataba de manera diferente que su isómero cis. Utilizaron tres ácidos grasos relacionados de 18 átomos de carbono para explorar la diferencia en la β-oxidación entre los isómeros cis y trans del ácido graso de igual tamaño.



Ácido esteárico
(ácido octadecenoico)



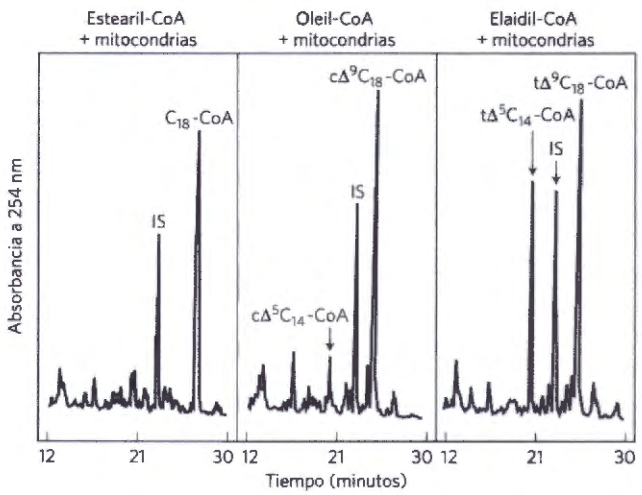
Ácido oleico
(ácido *cis*-Δ⁹-octadecenoico)



Ácido elaídico
(ácido *trans*-Δ⁹-octadecenoico)

CORY-STATION

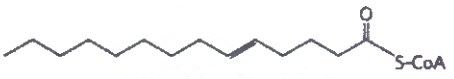
Incubaron el derivado de cada ácido con el coenzima A con mitocondrias de hígado de rata durante 5 minutos, a continuación separaron los derivados de CoA que aún permanecían en cada mezcla mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). A continuación se muestran los resultados con paneles separados para cada experimento.



En la figura IS indica un estándar interno (pentadecanil-CoA) añadido a la mezcla, después de la reacción, como marcador molecular. Los investigadores dieron las siguientes abreviaturas a los derivados del CoA: estearil-CoA, C_{18}-CoA; *cis*-Δ⁵-tetradecenil-CoA, cΔ⁵C_{14}-CoA; oleil-CoA, cΔ⁹C_{18}-CoA; *trans*-Δ⁵-tetradecenil-CoA; tΔ⁵C_{14}-CoA y elaidil-CoA, tΔ⁹C_{18}-CoA.



cis-Δ⁵-Tetradecenil-CoA



trans-Δ⁵-Tetradecenil-CoA

(a) ¿Por qué Yu y colaboradores tuvieron que utilizar derivados del CoA y no los ácidos grasos libres en estos experimentos?

(a)¿Por qué no se encontraron derivados del CoA de menor masa molecular en la reacción con estearil-CoA?

(a)¿Cuántas vueltas de β-oxidación serían necesarias para convertir el oleil-CoA y el elaidil-CoA en *cis*-Δ⁵tetradecenil-CoA y *trans*-Δ⁵-tetradecenil-CoA, respectivamente?

Yu y colaboradores midieron los parámetros cinéticos de las dos formas del enzima acil-CoA deshidrogenasa: acil (de cadena larga)-CoA deshidrogenasa (LCAD) y acil (de cadena muy larga)-CoA deshidrogenasa (VLCAD). Utilizaron los derivados CoA de tres ácidos grasos: tetradecanil-CoA (C_{14}-CoA), *cis*-Δ⁵-tetradecenil-CoA (cΔ⁵C_{14}-CoA) y *trans*-Δ⁵-tetradecenil-CoA (tΔ⁵C_{14}-CoA). Los resultados se muestran a continuación. (Véase el Capítulo 6 para las definiciones de los parámetros cinéticos).

	LCAD			VLCAD		
	C_{14}-CoA	cΔ⁵C_{14}-CoA	tΔ⁵C_{14}-CoA	C_{14}-CoA	cΔ⁵C_{14}-CoA	tΔ⁵C_{14}-CoA
V_{max}	3,3	3,0	2,9	1,4	0,32	0,88
K_m	0,41	0,40	1,6	0,57	0,44	0,97
k_{cat}	9,9	8,9	8,5	2,0	0,42	1,12
k_{cat}/K_m	24	22	5	4	1	1

(a) Para LCAD, la K_m difiere mucho entre los sustratos cis y trans. Dé una explicación plausible para esta observación en función de las estructuras de las moléculas de sustrato. (Pista: La Fig. 10-1 puede serle de utilidad).

(a) Los parámetros cinéticos de los dos enzimas son pertinentes de cara a la modificación diferencial de estos ácidos grasos *sólo* si la reacción de la LCAD o de la VLCAD (o ambas) es el paso limitante de velocidad de la ruta. ¿Qué pruebas hay que apoyen esta suposición?

(a)¿De qué modo estos parámetros cinéticos diferentes explican los diferentes niveles de los derivados de CoA encontrados después de la incubación de las mitocondrias de hígado de rata con estearil-CoA, oleil-CoA y elaidil-CoA (mostrados en la figura de tres paneles)?

Yu y colaboradores midieron la especificidad de sustrato de la tioesterasa de mitocondrias de hígado de rata, que hidroliza los acil-CoA a CoA y ácidos grasos libres. Este enzima tenía aproximadamente una actividad doble con tioésteres de C_{14}-CoA que con tioésteres de C_{18}-CoA.

Otras investigaciones han sugerido que los ácidos grasos libres pueden pasar a través de membranas. En sus experimentos, Yu y colaboradores encontraron ácido *trans*-Δ⁵-tetra-

decenoico fuera de la mitocondria (es decir, en el medio que las rodea) que se había incubado con elaidil-CoA. Describa la ruta que llevó a esta localización extramitocondrial del ácido *trans*-Δ^6-tetradecenoico. Asegúrese de indicar en qué lugar de la célula tienen lugar las diferentes transformaciones, así como de los enzimas que catalizan estas transformaciones.

Se dice a menudo en la prensa popular que "sus células no degradan las grasas trans y que, por tanto, se acumulan en su cuerpo". ¿En qué sentido es correcta esta afirmación y en qué sentido es una simplificación?

Referencia

Yu, W., X. Liang, R. Ensenauer, J. Vockley, L. Sweetman, and H. Schultz. 2004. Leaky β-oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* 279:52,160–52,167.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 18

Oxidación de aminoácidos y producción de urea

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino 674

18.2 Excreción de nitrógeno y ciclo de la urea 681

18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos 687

COPYSTATION

Centraremos ahora nuestra atención en los aminoácidos, la última clase de biomoléculas que, a través de su degradación oxidativa, contribuyen de manera significativa a la generación de energía metabólica. La fracción de la energía metabólica generada a partir de los aminoácidos, ya sean procedentes de proteínas de la dieta o de proteínas de los tejidos, varía mucho según el tipo de organismo y de las condiciones metabólicas. Los carnívoros consumen preferentemente proteína y, por tanto, han de obtener la mayor parte de su energía a partir de aminoácidos, mientras que los herbívoros sólo pueden cubrir una pequeña parte de sus necesidades energéticas a través de esta ruta. La mayoría de microorganismos pueden nutrirse de aminoácidos del entorno y utilizarlos como combustible si las condiciones metabólicas lo requieren. Las plantas, sin embargo, raramente oxidan aminoácidos, si es que lo llegan a hacer, para obtener energía; los glúcidos producidos a partir de CO_2 y H_2O en la fotosíntesis son utilizados como fuente casi exclusiva de energía. Las concentraciones de los aminoácidos en los tejidos vegetales están reguladas cuidadosamente con la finalidad exclusiva de cubrir las necesidades para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas necesarias para el crecimiento. En las plantas se produce catabolismo de aminoácidos, pero su finalidad es la producción de metabolitos para otras rutas biosintéticas.

En los animales, los aminoácidos experimentan degradación oxidativa en tres situaciones metabólicas diferentes.

1. Durante la síntesis y degradación normales de proteínas celulares (recambio proteico; Capítulo 27), algunos de los aminoácidos liberados durante la degradación de las proteínas se degradan oxidativamente si no se necesitan para la síntesis de nuevas proteínas.
2. Cuando una dieta es rica en proteínas y los aminoácidos ingeridos exceden las necesidades corporales para la síntesis de proteínas, se cataboliza el excedente; los aminoácidos no se pueden almacenar.
3. Durante la inanición o en la diabetes mellitus incontrolada, en las que no hay glúcidos disponibles o éstos no son utilizados adecuadamente, se recurre a las proteínas celulares como combustible.

En todas estas circunstancias metabólicas, los aminoácidos pierden sus grupos amino para formar α-cetoácidos, los "esqueletos carbonados" de los aminoácidos. Los α-cetoácidos experimentan oxidación a CO_2 y H_2O y, a menudo y más importante, proporcionan unidades de tres y cuatro carbonos que pueden convertirse a través de la gluconeogénesis en glucosa, el combustible para el cerebro, músculo esquelético y otros tejidos.

Las rutas del catabolismo de los aminoácidos son muy semejantes en la mayoría de organismos. Este capítulo se centra en las rutas de los vertebrados, puesto que éstas son las que se han investigado con mayor atención. Al igual que en el caso del catabolismo de los glúcidos y ácidos grasos, los procesos de la degradación de aminoácidos convergen en las rutas catabólicas centrales. Los esqueletos carbonados de la mayoría de los aminoácidos van a parar al ciclo del ácido cítrico. En algunos casos, las rutas de reacción de la degradación de los aminoácidos siguen un estrecho paralelismo con el catabolismo de los ácidos grasos (véase la Fig. 17-9).

Existe una característica importante que distingue la degradación de aminoácidos de los otros procesos catabólicos descritos hasta este momento: cada aminoácido contiene un grupo amino. Por tanto, las rutas de degradación de los aminoácidos incluyen un paso clave en el que se separa el grupo α-amino del esqueleto carbonado desviándolo hacia rutas de metabolismo del

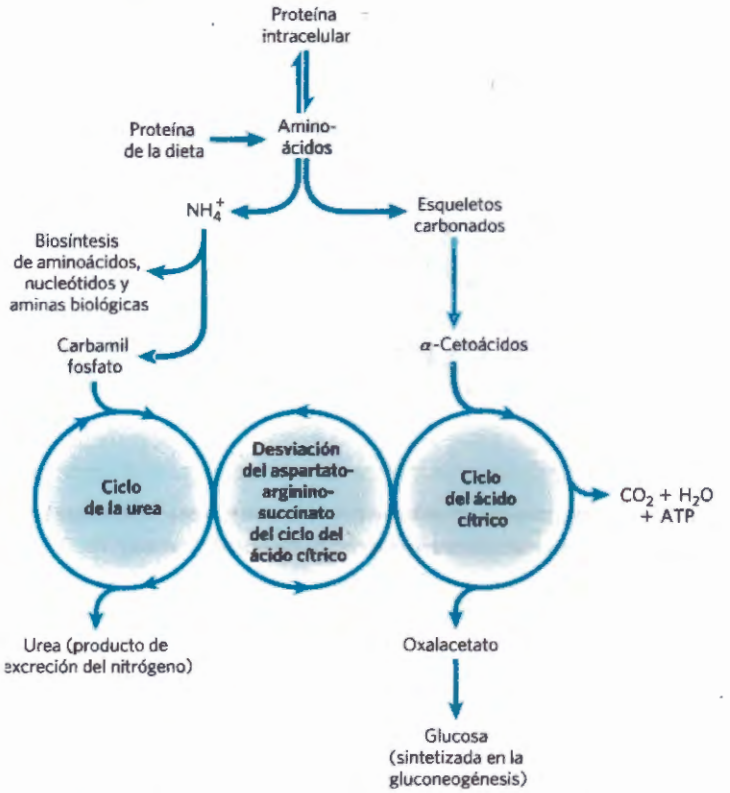


FIGURA 18-1 Visión general del catabolismo de los aminoácidos en los mamíferos. Los grupos amino y el esqueleto carbonado siguen rutas separadas pero interconectadas.

COPY-STATION

grupo amino **(Fig. 18-1)**. Trataremos en primer lugar el metabolismo del grupo amino y la excreción de nitrógeno y, a continuación, seguiremos con el destino de los esqueletos carbonados obtenidos a partir de los aminoácidos; a lo largo de la explicación veremos cómo están interconectadas las rutas.

18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino

El nitrógeno, N_2, es abundante en la atmósfera, pero es demasiado inerte para su utilización en la mayoría de procesos bioquímicos. Debido a que sólo unos pocos microorganismos pueden convertir N_2 en formas biológicamente útiles tales como el NH_3 (Capítulo 22), los grupos amino se utilizan de forma muy conservadora en los sistemas biológicos.

La **Figura 18-2a** presenta una visión general del catabolismo del amoníaco y de los grupos amino en los vertebrados. Los aminoácidos obtenidos a partir de las proteínas de la dieta son la fuente de la mayor parte de grupos amino. La mayoría de aminoácidos se metabolizan en el hígado. Parte del amoníaco generado en este proceso se recicla y se utiliza en diversas rutas biosintéticas; el exceso se excreta directamente o se convierte en urea o ácido úrico para su excreción, según el organismo (Fig. 18-2b). El exceso de amoníaco generado en otros tejidos (extrahepáticos) se transporta al hígado (en forma de grupos amino tal como se describe más adelante) para su conversión en la forma de excreción.

Cuatro aminoácidos tienen un papel central en el metabolismo del nitrógeno: glutamato, glutamina, alanina y aspartato. El lugar especial de estos cuatro aminoácidos en el metabolismo del nitrógeno no es un accidente evolutivo. Estos aminoácidos concretos son los que se convierten más fácilmente en intermediarios del ciclo del ácido cítrico: glutamato y glutamina en α-cetoglutarato, alanina en piruvato y aspartato en oxalacetato. El glutamato y la glutamina desempeñan papeles especialmente críticos actuando como una especie de punto general de recogida de grupos amino. En el citosol de las células hepáticas (hepatocitos), los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos se transfieren al α-cetoglutarato formando glutamato. A continuación se transporta el glutamato a la mitocondria, donde cede el grupo amino para formar NH_4^+. El exceso de amoníaco generado en la mayor parte de los tejidos restantes se convierte en el nitrógeno amídico de la glutamina, que pasa al hígado y, seguidamente, a las mitocondrias del mismo. En la mayoría de tejidos, la glutamina o el glutamato, o ambos, se encuentran en concentraciones más elevadas que el resto de aminoácidos.

En el músculo esquelético, los grupos amino en exceso se transfieren generalmente al piruvato formando alanina, otra molécula importante en el transporte de grupos amino hasta el hígado. Veremos en la Sección 18.2 que el aspartato entra en acción en los procesos metabólicos que tienen lugar una vez que los grupos amino se encuentran en el hígado.

Empezaremos ahora una explicación sobre la degradación de las proteínas de la dieta, seguida de una descripción general de los destinos metabólicos de los grupos amino.

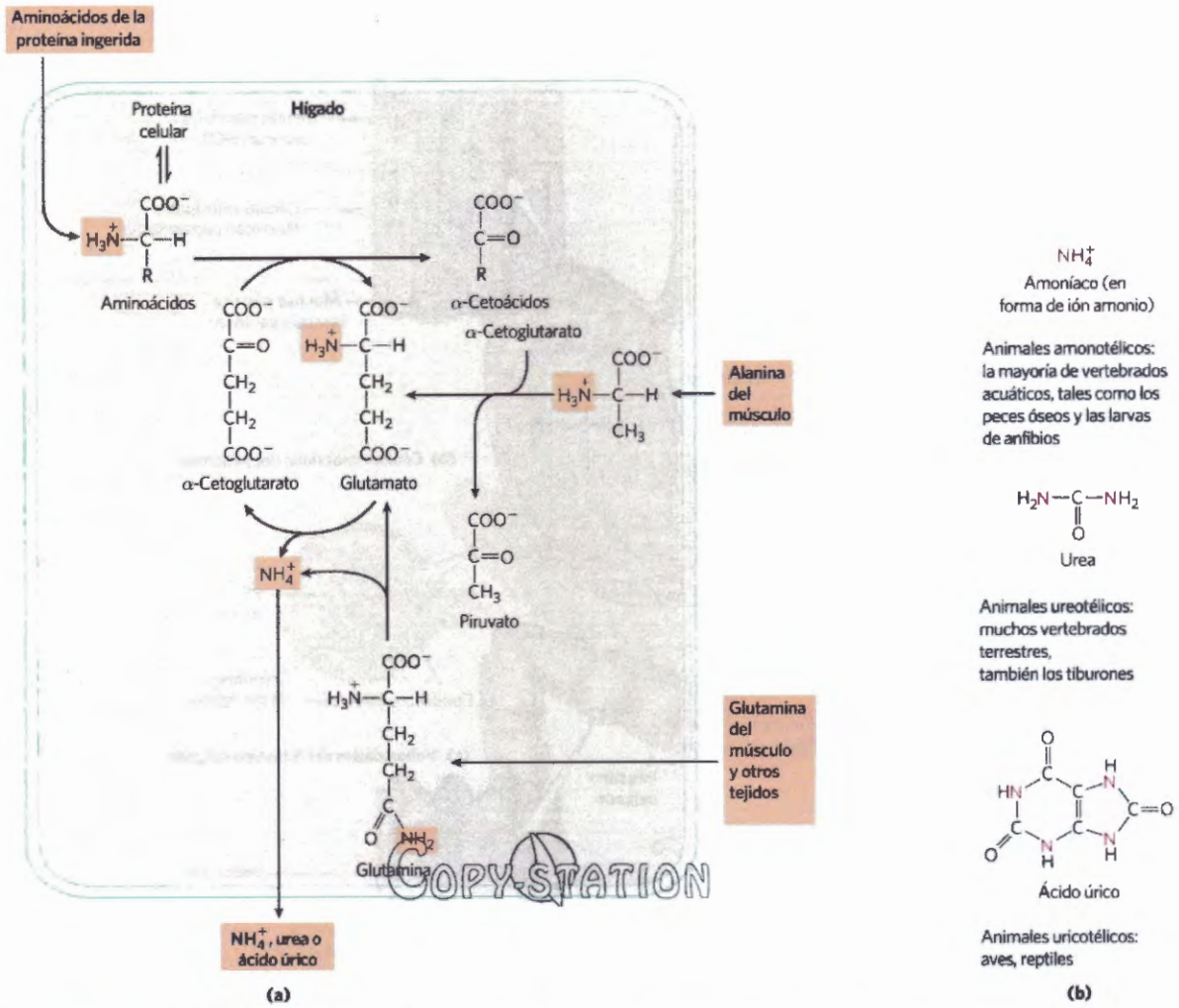


FIGURA 18-2 Catabolismo del grupo amino (a) Visión general del catabolismo del grupo amino (sombreado) en el hígado de vertebrados. **(b)** Formas de excreción del nitrógeno. El exceso de NH_4^+ se excreta en forma de amoníaco (microbios, peces óseos), urea (la mayor parte de vertebrados terrestres), o ácido úrico (aves y reptiles terrestres). Observe que los átomos de carbono de la urea y el ácido úrico están muy oxidados; el organismo sólo desecha el carbono tras extraer la mayor parte de su energía de oxidación disponible.

La proteína de la dieta se degrada enzimáticamente a aminoácidos

En los seres humanos, la degradación de las proteínas ingeridas a sus aminoácidos constituyentes tiene lugar en el tracto gastrointestinal. La entrada de proteína de la dieta en el estómago estimula la secreción de la hormona **gastrina** por la mucosa gástrica la cual, a su vez, estimula la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales y pepsinógeno por las células principales de las glándulas gástricas **(Fig. 18-3a)**. El jugo gástrico ácido (pH 1,0 a 2,5) es tanto un antiséptico, que mata la mayor parte de bacterias y células foráneas, como un agente desnaturalizante, que despliega las proteínas globulares y hace que sus enlaces peptídicos internos sean más asequibles a la hidrólisis enzimática. El **pepsinógeno** (M_r 40.554), un precursor inactivo o zimógeno, se convierte en pepsina activa (M_r 34.614) por rotura autocatalítica (una rotura debida a la acción del propio pepsinógeno) que sólo tiene lugar a pH bajo. En el estómago, la pepsina hidroliza las proteínas ingeridas a nivel de los enlaces peptídicos que están en el lado amino-terminal de los residuos aminoácidos aromáticos, Phe Trp y Tyr (véase la Tabla 3-6), cortando cadenas polipeptídicas largas que dan una mezcla de péptidos más pequeños.

A medida que el contenido ácido del estómago pasa al intestino delgado, el bajo pH desencadena la secreción de la hormona **secretina** a la sangre. La secretina estimula el páncreas para que secrete bicarbonato al intestino delgado para neutralizar el HCl gástrico, incrementando el pH de manera abrupta hasta alrededor de 7. (Todas las secreciones pancreáticas pasan al intestino delgado a través del conducto pancreático). La digestión de las proteínas continúa ahora en el intestino delgado. La entrada de aminoácidos en la parte superior del intestino (duodeno) produce la liberación a la sangre de la hormona **colecistoquinina**, que estimula la secreción de varios enzimas pancreáticos con actividad óptima a pH entre 7 y 8. El **tripsinógeno**, **quimotripsinógeno** y las **procarboxipeptidasas A** y **B**, que son los zimógenos de la **tripsina**, **quimotripsina** y las **carboxipeptidasas A** y **B**, se sintetizan y excretan por las células exocrinas del páncreas (Fig. 18-3b). El tripsinógeno se convierte en su forma activa, tripsina, por la

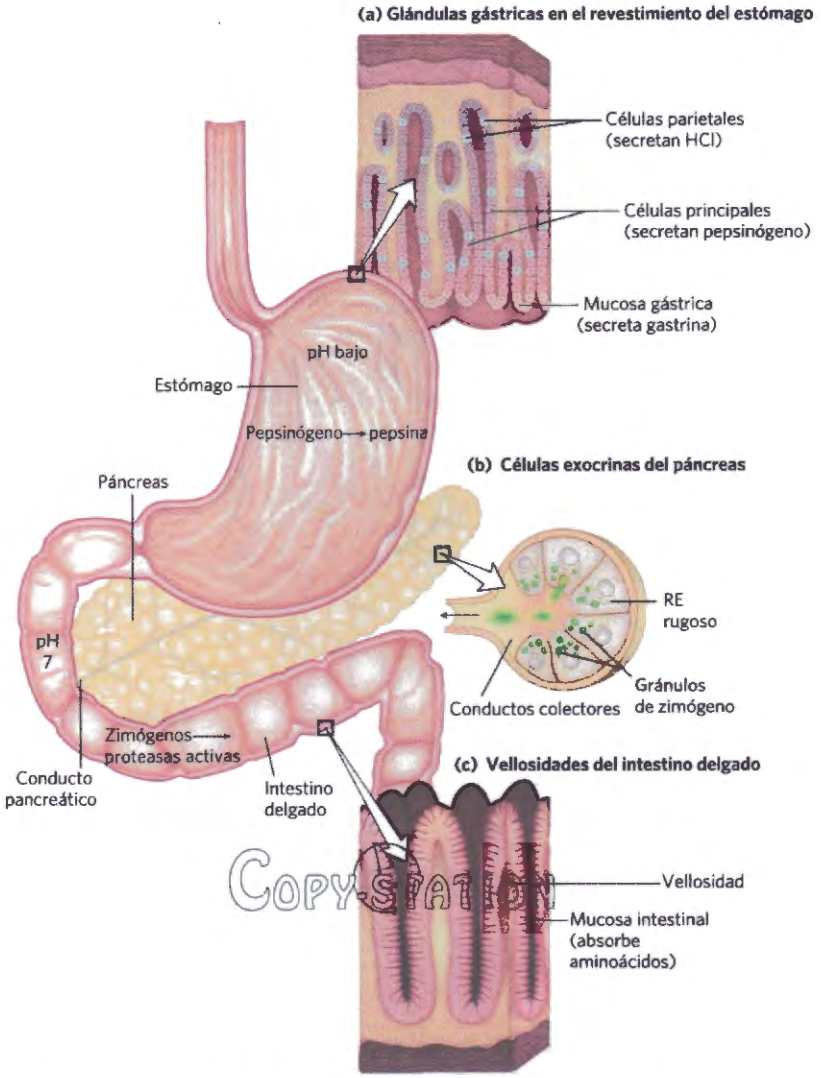


FIGURA 18-3 Porción del tracto digestivo (gastrointestinal) humano. **(a)** Las células parietales y las células principales de las glándulas gástricas secretan sus productos en respuesta a la hormona gastrina. La pepsina inicia el proceso de degradación de las proteínas en el estómago. **(b)** El citoplasma de las células exocrinas está totalmente relleno de retículo endoplasmático rugoso, sitio de la síntesis de los zimógenos de muchos enzimas digestivos. Los zimógenos se concentran en partículas de transporte rodeadas de membrana denominadas gránulos de zimógeno. Cuando se estimula una célula exocrina, su membrana plasmática se fusiona con la membrana de los gránulos de zimógeno y éstos se liberan por exocitosis en la luz de los conductos colectores. Los conductos colectores llegan finalmente al conducto pancreático y de ahí al intestino delgado. **(c)** En el intestino delgado los aminoácidos se absorben a través de la capa de células epiteliales (mucosa intestinal) de las vellosidades y entran en los capilares. Recuerde que los productos de la hidrólisis de lípidos en el intestino delgado entran en el sistema linfático después de su absorción por la mucosa intestinal (véase la Fig. 17-1).

enteropeptidasa, un enzima proteolítico secretado por las células intestinales. La tripsina libre cataliza a continuación la conversión de más tripsinógeno en tripsina (véase la Fig. 6-39). La tripsina activa también el quimotripsinógeno, las procarboxipeptidasas y la proelastasa.

¿Por qué este complicado mecanismo para obtener enzimas digestivos activos en el tracto gastrointestinal? La síntesis de los enzimas en forma de precursores inactivos protege a las células exocrinas de un ataque proteolítico destructor. El páncreas se autoprotege además contra la propia digestión produciendo un inhibidor específico, una proteína, denominada **inhibidor pancreático de tripsina**. Dado el papel clave de la tripsina en las rutas de activación proteolítica, la inhibición de la tripsina evita de forma efectiva la producción prematura de enzimas proteolíticos activos dentro de las células pancreáticas.

La tripsina y la quimotripsina hidrolizan aún más los péptidos resultantes de la acción de la pepsina en el estómago. Esta fase de la digestión de proteínas se realiza muy eficientemente debido a que la pepsina, tripsina y quimotripsina tienen especificidad de aminoácidos diferentes (véase la Tabla 3-6). La degradación de los péptidos cortos en el intestino delgado se completa ahora con otras peptidasas intestinales. Estas incluyen las carboxipeptidasas A y B (las dos son enzimas que contienen zinc), que eliminan residuos carboxilo-terminales sucesivos de los péptidos, y una **aminopeptidasa** que hidroliza residuos amino-terminales sucesivos de

péptidos cortos. La mezcla resultante de aminoácidos libres se transporta a las células epiteliales que cubren el intestino delgado (Fig. 18-3c) a través de las cuales los aminoácidos entran en los capilares sanguíneos en las vellosidades y se transportan al hígado. En los seres humanos, la mayor parte de las proteínas globulares de origen animal se hidrolizan casi completamente a aminoácidos en el tracto gastrointestinal, pero algunas proteínas fibrosas, tales como la queratina, sólo son parcialmente digeridas. Además, el contenido proteico de algunos alimentos vegetales está protegido contra la degradación por cáscaras de celulosa no digeribles.

La **pancreatitis aguda** es una enfermedad producida por la obstrucción de la vía normal por la que las secreciones pancreáticas entran en el intestino. Los zimógenos de los enzimas proteolíticos se convierten prematuramente en sus formas catalíticamente activas, *dentro* de las células pancreáticas y atacan al propio tejido pancreático, causando una destrucción seria y muy dolorosa del órgano, que puede ser mortal. ■

El piridoxal fosfato participa en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato

El primer paso del catabolismo de la mayoría de l-aminoácidos, una vez han llegado al hígado, es la eliminación de los grupos α-amino, catalizada por enzimas denominados **aminotransferasas** o **transaminasas**. En estas reacciones de **transaminación**, el grupo α-amino se transfiere al átomo de carbono α del α-cetoglutarato, dejando el α-cetoácido correspondiente al aminoácido **(Fig. 18-4)**. En estas reacciones no se produce una desaminación neta (es decir pérdida de grupos amino), porque el α-cetoglutarato se amina a la vez que se desamina el α-aminoácido. El efecto de las reacciones de transaminación es recoger los grupos amino de muchos aminoácidos diferentes en forma de l-glutamato. El glutamato funciona a continuación como dador de grupos amino para rutas biosintéticas o para rutas de excreción que conducen a la eliminación de productos nitrogenados de desecho.

Las células contienen varios tipos de aminotransferasas. Muchas son específicas para el α-cetoglutarato como aceptor de grupos amino, pero difieren en su especificidad para el l-aminoácido. Estos enzimas se nombran en función del dador del grupo amino (por ejemplo, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa). Las reacciones catalizadas por las aminotransferasas son libremente reversibles teniendo una constante de equilibrio de alrededor de 1,0 ($\Delta G'^{\circ} \approx 0$ kJ/mol).

Todas las aminotransferasas tienen el mismo grupo prostético y un mismo mecanismo de reacción. El grupo prostético es el **piridoxal fosfato (PLP)**, forma coenzimática de la piridoxina o vitamina B_6. El piridoxal fosfato ya se encontró en el Capítulo 15, como coenzima de la reacción de la glucógeno fosforilasa. No obstante, su papel en aquella reacción no es representativo de su función coenzimática usual. Su papel principal en las células tiene lugar en el metabolismo de moléculas con grupos amino.

El piridoxal fosfato funciona como un transportador intermedio de grupos amino en el sitio activo de las aminotransferasas. Experimenta transformaciones reversibles entre su forma aldehído, piridoxal fosfato,

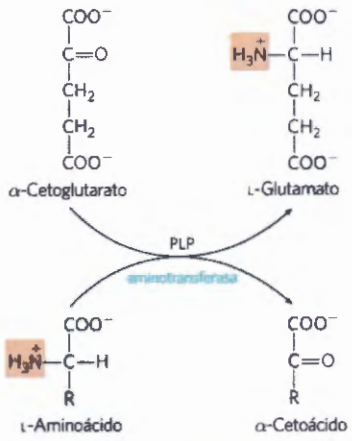


FIGURA 18-4 Transaminación catalizada enzimáticamente. En las reacciones de muchas aminotransferasas el α-cetoglutarato es el aceptor del grupo amino. Todas las aminotransferasas utilizan el piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. Aunque la reacción se muestra aquí en la dirección de transferencia del grupo amino al α-cetoglutarato, es fácilmente reversible.

que puede aceptar un grupo amino, y su forma aminada, piridoxamina fosfato, que puede ceder su grupo amino a un α-cetoácido **(Fig. 18-5a)**. El piridoxal fosfato está generalmente unido de manera covalente al sitio activo del enzima a través de un enlace aldimino (base de Schiff) al grupo ε-amino de un residuo Lys (Fig. 18-5b, d).

El piridoxal fosfato interviene en una serie de reacciones de los carbonos α, β y γ (C-2 a C-4) de los aminoácidos. Las reacciones en el carbono α **(Fig. 18-6)** incluyen racemizaciones (interconversión de l- y D-aminoácidos) y descarboxilaciones, además de las transaminaciones. El piridoxal fosfato juega el mismo papel químico en todas estas reacciones. Se rompe uno de los enlaces con el carbono α del sustrato eliminando un protón o un grupo carboxilo. El par electrónico que queda sobre el carbono α forma un carbanión muy inestable pero el piridoxal fosfato lo estabiliza por resonancia (Fig. 18-6 recuadro). La estructura altamente conjugada del PLP (un sumidero electrónico) permite la deslocalización de la carga negativa.

Las aminotransferasas (Fig. 18-5) son ejemplos clásicos de enzimas que catalizan reacciones bimoleculares Ping-Pong (véase la Fig. 6-13b, d), en las que el primer sustrato reacciona, y a continuación su producto ha de abandonar el centro activo antes de que se pueda unir el segundo sustrato. Así, el aminoácido entrante se une al sitio activo, cede su grupo amino al piridoxal fosfato y sale en forma de α-cetoácido. A continuación se une el α-cetoácido entrante, acepta el grupo amino de la piridoxamina fosfato y sale en forma de aminoácido.

El glutamato libera su grupo amino en forma de amoníaco en el hígado

Tal como hemos visto, los grupos amino de muchos α-aminoácidos se recogen en el hígado en forma del grupo amino de moléculas de l-glutamato. A continuación estos grupos amino han de eliminarse del glutamato para prepararlos para la excreción. En los hepatocitos, el glutamato se transporta desde el citosol a la

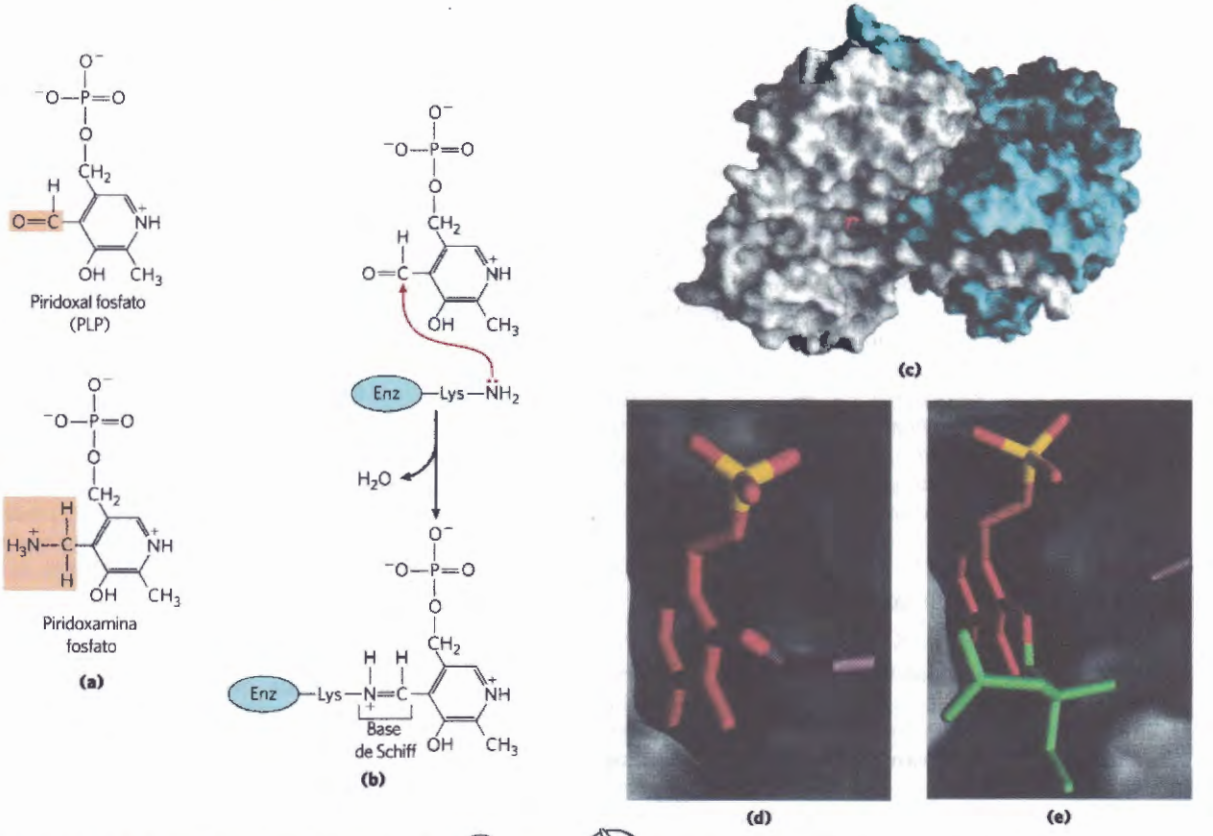


FIGURA 18-5 Piridoxal fosfato, grupo prostético de las aminotransferasas. **(a)** El piridoxal fosfato (PLP) y su forma aminada, piridoxamina fosfato, son los coenzimas, fuertemente unidos, de las aminotransferasas. Los grupos funcionales están sombreados. **(b)** El piridoxal fosfato se une al enzima mediante interacciones no covalentes y una unión por base de Schiff (aldimina) con un residuo Lys del sitio activo. Los pasos para la formación de la base de Schiff entre una amina primaria y un grupo carbonilo se detallan en la Figura 14-6; **(c)** PLP (en rojo) unido a uno de los dos sitios activos del enzima dimérico aspartato aminotransferasa, una aminotransferasa típica; **(d)** vista ampliada del sitio activo, con el PLP (en rojo, con el fósforo en amarillo) unido por enlace aldimina con la cadena lateral de la Lys^{258} (púrpura); **(e)** otra vista ampliada del sitio activo, con el PLP unido al análogo del sustrato 2-metilaspartato (en verde) vía una base de Schiff [Fuente: (c, d, e) PDB ID 1AJS. S. Rhee et al., *J. Biol. Chem.* 272:17.293, 1997].

Copy Station

mitocondria en donde experimenta **desaminación oxidativa** catalizada por la **L-glutamato deshidrogenasa** (M_r 330.000). En los mamíferos, este enzima se encuentra en la matriz mitocondrial. Es el único enzima que puede utilizar tanto NAD^+ como $NADP^+$ como aceptor de los equivalentes de reducción **(Fig. 18-7)**.

La acción combinada de una aminotransferasa y la glutamato deshidrogenasa se conoce como **transdesaminación**. Algunos aminoácidos se saltan la ruta de transdesaminación y experimentan desaminación oxidativa directa. En la Sección 18.2 se explica con detalle el destino del NH_4^+ producido por cualquiera de estos procesos de desaminación. El α-cetoglutarato formado a partir de la desaminación del glutamato puede utilizarse en el ciclo del ácido cítrico y para la síntesis de glucosa.

La glutamato deshidrogenasa actúa en una importante intersección de los metabolismos del carbono y del nitrógeno. Es un enzima alostérico con seis subunidades idénticas y su actividad está influida por un complicado conjunto de moduladores alostéricos. Los mejor estudiados son el modulador positivo ADP y el modulador negativo GTP. No se ha aclarado con detalle la explicación metabólica de este patrón de regulación. Las mutaciones que alteran el sitio alósterico de unión de GTP, o que causan de alguna otra forma la activación permanente de la glutamato deshidrogenasa, conducen a un trastorno genético humano denominado síndrome de hiperinsulinismo-hiperamonemia, que se caracteriza por niveles elevados de amoníaco en la sangre acompañados de hipoglucemia.

La glutamina transporta amoníaco en el torrente circulatorio

El amoníaco es muy tóxico para los tejidos animales (más adelante examinaremos algunas posibles razones de su toxicidad) por lo que sus niveles en sangre están regulados. En muchos tejidos, incluido el cerebro, se genera amoníaco libre a través de algunos procesos tales como la degradación de nucleótidos. En la mayoría de animales gran parte del amoníaco libre se convierte en un compuesto no tóxico antes de ser exportado de los tejidos extrahepáticos a la sangre y transportado al hígado o los riñones. El glutamato, que es tan importante para el metabolismo *intracelular* de grupos amino, es sustituido por la l-glutamina para esta función de transporte. El amoníaco libre producido en los tejidos

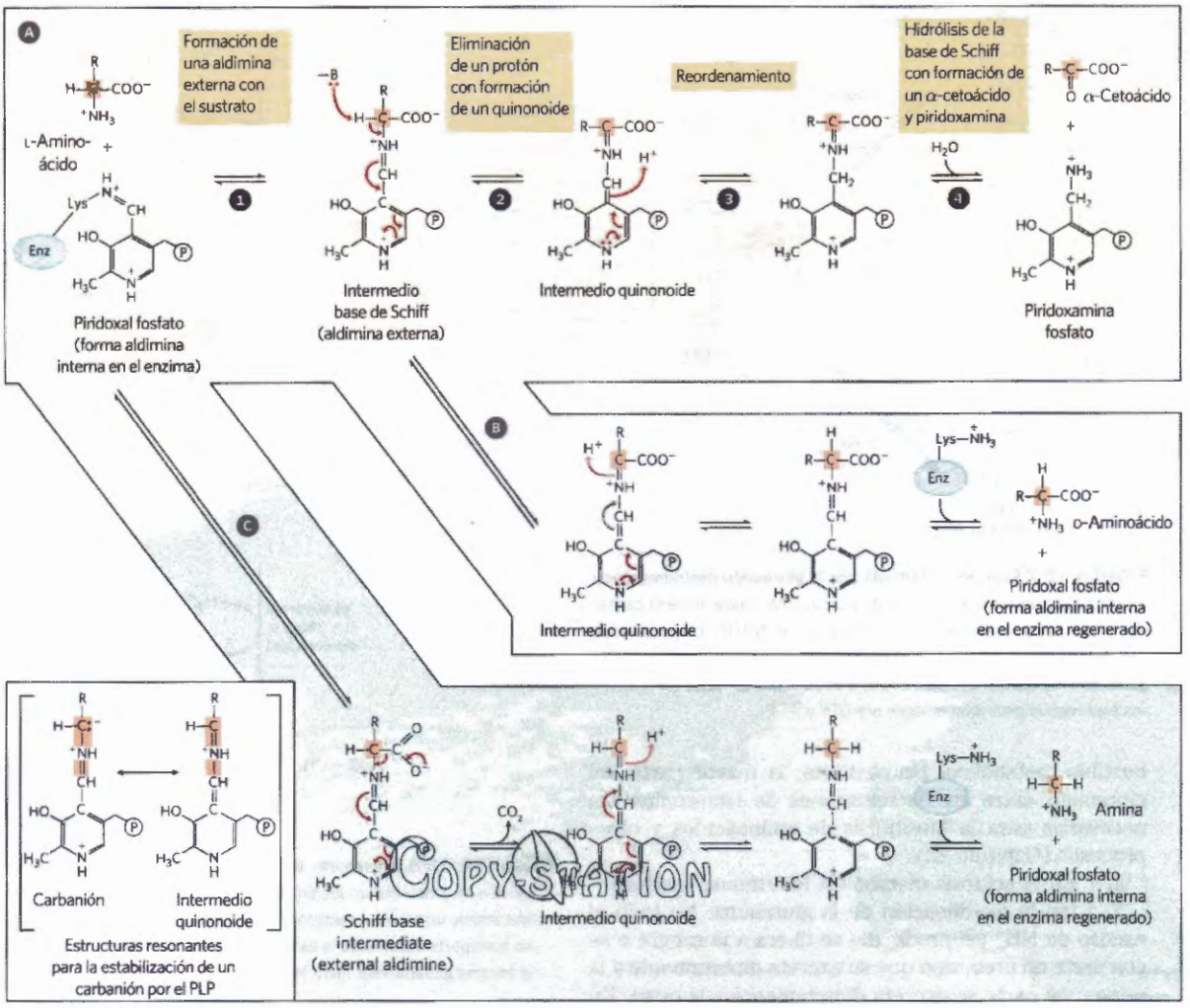


FIGURA DE MECANISMO 18-6 Algunas de las transformaciones en el carbono α de aminoácidos facilitadas por el piridoxal fosfato. El piridoxal fosfato se encuentra generalmente unido al enzima por medio de una base de Schiff, también llamada aldimina interna. Esta forma activada del PLP se transamina fácilmente con formación de una nueva base de Schiff (aldimina externa) con el grupo α-amino del aminoácido sustrato. Se muestran tres destinos alternativos para la aldimina externa: A transaminación, B racemización y C descarboxilación. La base de Schiff formada entre el PLP y el aminoácido está conjugada con el anillo de piridina, que actúa como un sumidero electrónico que permite la deslocalización de un par electrónico para evitar la formación de un carbanión inestable sobre el carbono α (recuadro). En los tres tipos de reacciones interviene un intermedio quinonoide. La ruta de la transaminación A es especialmente importante en las rutas descritas en este capítulo. La ruta resaltada aquí en amarillo (mostrada de izquierda a derecha) sólo representa una parte de la reacción global catalizada por las aminotransferasas. Para completar el proceso, un segundo α-cetoácido reemplaza el que se ha liberado y se convierte en aminoácido en una inversión de los pasos de reacción (de derecha a izquierda). El piridoxal fosfato interviene también en determinadas reacciones en los carbonos β y γ de algunos aminoácidos (no se muestra).

se combina con glutamato dando glutamina por acción de la **glutamina sintetasa**. Esta reacción requiere ATP y tiene lugar en dos pasos **(Fig. 18-8)**. En el primer paso, el glutamato y el ATP reaccionan formando ADP y un intermedio γ-glutamil fosfato que reacciona a continuación con el amoníaco produciendo glutamina y fosfato inorgánico. La glutamina constituye una forma de transporte no tóxica del amoníaco; normalmente está presente en la sangre en concentraciones mucho mayores que otros aminoácidos. La glutamina sirve además de fuente de grupos amino en diversas reacciones biosintéticas. La glutamina sintetasa está presente en todos los organismos, desempeñando siempre un papel metabólico central. En los microorganismos, este enzima constituye un portal esencial para la entrada del nitrógeno fijado en los sistemas biológicos. (Las funciones de la glutamina y de la glutamina sintetasa en el metabolismo se volverán a tratar en el Capítulo 22).

En la mayoría de animales terrestres, la glutamina en exceso respecto a la necesaria para la biosíntesis se transporta por la sangre al intestino, hígado y riñones para su tratamiento. En estos tejidos el nitrógeno amídico se libera en forma de ión amonio dentro de las mitocondrias, en donde el enzima **glutaminasa** convierte la glutamina en glutamato y NH_4^+ (Fig. 18-8). El NH_4^+ del intestino y riñón se transporta por la sangre al hígado. En el hígado, el amoníaco de todas estas fuentes se elimina mediante la síntesis de urea. Parte del glutamato producido en la reacción de la glutaminasa puede ser aún modificado en el hígado por la glutamato deshidrogenasa, liberando más amoníaco y produciendo esqueletos carbonados para ser utilizados como com-

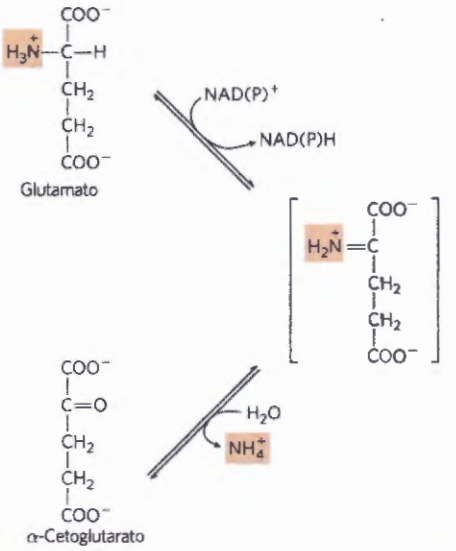


FIGURA 18-7 Reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa. La glutamato deshidrogenasa hepática de los mamíferos tiene la capacidad poco común de utilizar tanto NAD^+ como $NADP^+$ como cofactor. Las glutamato deshidrogenasas de las plantas y microorganismos son generalmente específicas para el uno o el otro. El enzima de los mamíferos está regulado alostéricamente por GTP y ADP.

bustible metabólico. No obstante, la mayor parte del glutamato entra en las reacciones de transaminación necesarias para la biosíntesis de aminoácidos y otros procesos (Capítulo 22).

En la acidosis metabólica los riñones incrementan la modificación de la glutamina. No todo el exceso de NH_4^+ así producido se libera a la sangre o se convierte en urea, sino que se excreta directamente a la orina: una parte se excreta directamente a la orina. En el riñón, el NH_4^+ forma sales con ácidos metabólicos, facilitando su eliminación en la orina. La descarboxilación del α-cetoglutarato en el ciclo del ácido cítrico proporciona también bicarbonato que puede servir como tampón en el plasma sanguíneo. En conjunto, estos efectos del metabolismo de la glutamina en los riñones tienden a contrarrestar la acidosis. ■

La alanina transporta amoníaco desde los músculos esqueléticos al hígado

La alanina también juega un papel especial en el transporte de grupos amino al hígado en una forma no tóxica, mediante una ruta denominada **ciclo de la glucosa-alanina (Fig. 18-9)**. En el músculo y en algunos otros tejidos que degradan aminoácidos como combustible, los grupos amino se recogen en forma de glutamato por transaminación (Fig. 18-2a). El glutamato puede entonces convertirse en glutamina para su transporte al hígado tal como se ha descrito, o puede transferir su grupo α-amino al piruvato, un producto de la glucólisis muscular fácilmente asequible, por acción de la **alanina aminotransferasa** (Fig. 18-9). La alanina así formada, pasa a la sangre y es transportada al hígado. En el citosol de los hepatocitos, la alanina aminotransferasa transfiere el grupo amino de la alanina al α-cetoglutarato, formando piruvato y glutamato. El glutamato puede

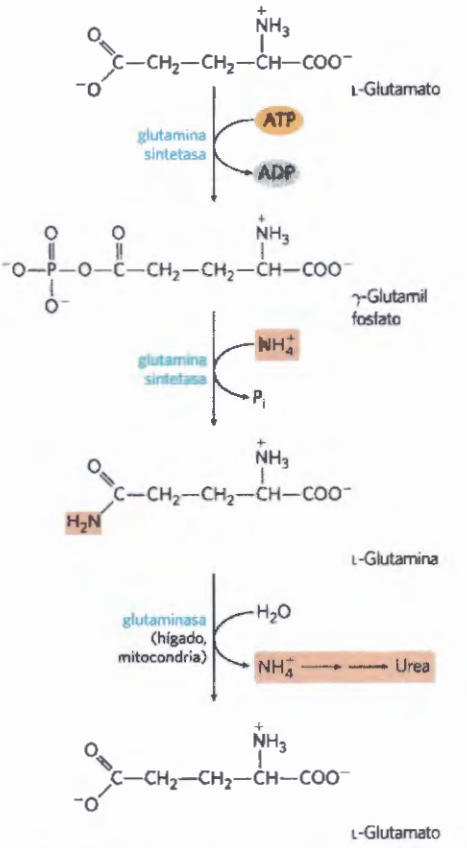


FIGURA 18-8 Transporte de amoníaco en forma de glutamina. El exceso de amoníaco de los tejidos se adiciona al glutamato en forma de glutamina, un proceso catalizado por la glutamina sintetasa. Después de su transporte a través de la sangre la glutamina entra en el hígado donde el enzima glutaminasa libera NH_4^+ en la mitocondria.

entrar en las mitocondrias, donde la reacción de la glutamato deshidrogenasa libera NH_4^+ (Fig. 18-7), o puede experimentar transaminación con oxalacetato formando aspartato que, tal como veremos, es otro dador de nitrógeno en la síntesis de urea.

La utilización de alanina para transportar amoníaco desde el músculo esquelético al hígado es otro ejemplo de la economía intrínseca de los organismos vivos. Los músculos esqueléticos sometidos a contracción vigorosa operan de forma anaeróbica, produciendo piruvato y lactato a partir de la glucólisis además de amoníaco a partir de la degradación de proteínas. Estos productos han de ir a parar al hígado, en donde el piruvato y el lactato se incorporan a la glucosa, que es devuelta a los músculos, y el amoníaco se convierte en urea para su excreción. El ciclo de la glucosa-alanina, junto con el ciclo de Cori (véase el Recuadro 14-2 y la Fig. 23-21), consiguen esta transacción. La carga energética de la gluconeogénesis se impone así al hígado y no al músculo, con lo que todo el ATP disponible en el músculo se dedica a la contracción muscular.

El amoníaco es tóxico para los animales

La producción catabólica de amoníaco plantea un problema bioquímico serio debido a que el amoníaco es muy tóxico. El cerebro es especialmente

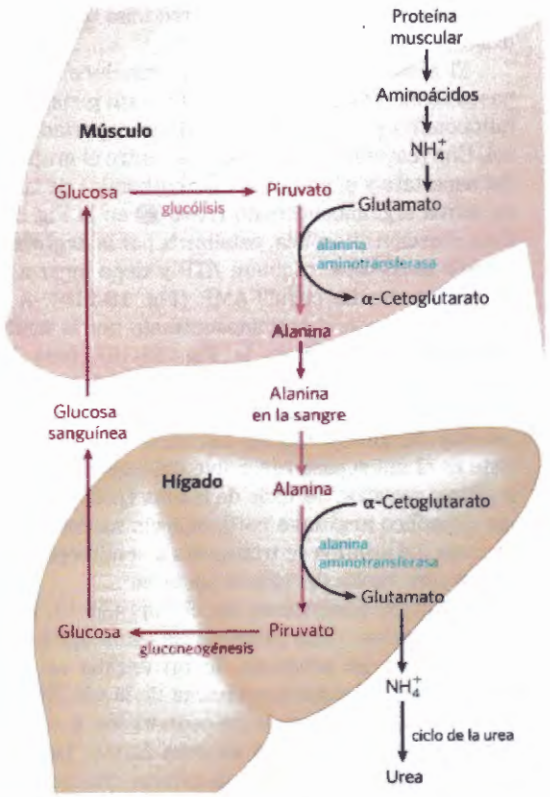


FIGURA 18-9 Ciclo de la glucosa-alanina. La alanina actúa como transportador de amoníaco y del esqueleto carbonado del piruvato desde el músculo esquelético al hígado. El amoníaco se excreta y el piruvato se utiliza para producir glucosa, que vuelve al músculo.

COPYSTATION

sensible; las lesiones debidas a la toxicidad del amoníaco producen deterioro cognitivo, ataxia y ataques epilépticos. En casos extremos aparece hinchazón del cerebro que conduce a la muerte. Están empezando a conocerse de manera gradual las bases moleculares de esta toxicidad. En la sangre, alrededor del 98% del amoníaco se encuentra en la forma protonada (NH_4^+), que no cruza la membrana plasmática. La pequeña cantidad de NH_3 presente cruza fácilmente todas las membranas, incluida la barrera hematoencefálica, lo que permite su entrada en las células, donde una gran parte adquiere un protón y puede acumularse en el interior de las células en forma de NH_4^+.

Para liberar al citosol del exceso de amoníaco es necesaria la aminación reductora del α-cetoglutarato a glutamato por la glutamato deshidrogenasa (el inverso de la reacción descrita anteriormente; Fig. 18-7) y la conversión del glutamato en glutamina por la glutamina sintetasa. En el cerebro, solo los astrocitos, células en forma de estrella del sistema nervioso que proporcionan nutrientes, sostén y aislamiento a las neuronas, expresan la glutamina sintetasa. El glutamato y su derivado γ-aminobutirato (GABA; véase la Fig. 22-31), son neurotransmisores importantes; parte de la sensibilidad del cerebro al amoníaco podría ser reflejo de una desaparición de glutamato en la reacción de la glutamina sintetasa. Sin embargo, la actividad glutamina sintetasa es insuficiente para afrontar el exceso de amoníaco, o para explicar totalmente su toxicidad.

Una $[NH_4^+]$ aumentada también altera la capacidad de los astrocitos para mantener la homeostasis del potasio a través de la membrana. El NH_4^+ compite con el K^+ para su transporte al interior de la célula mediante la Na^+K^+ ATPasa, lo que conduce a una $[K^+]$ extracelular elevada. El exceso de K^+ extracelular entra en las neuronas mediante un cotransportador paralelo (symport), el **cotransportador Na^+-K^+-$2Cl^-$ 1 (NKCC1)**, que lleva consigo Na^+ y $2Cl^-$. El exceso de Cl^- en estas neuronas altera su respuesta cuando el neurotransmisor GABA interacciona con sus receptores $GABA_A$, produciendo una despolarización anormal y una actividad neuronal aumentada que, probablemente, explica la incoordinación neuromuscular y los ataques que a menudo se producen como resultado del envenenamiento por amoníaco. Si la $[NH_4^+]$ extracelular permanece elevada, la perturbación de los canales iónicos y de acuaporina de los astrocitos provoca el hinchamiento de las células lo que resulta en un edema cerebral fatal. ■

Al cerrar esta discusión sobre el metabolismo del grupo amino, observe que hemos descrito varios procesos que depositan el exceso de amoníaco en las mitocondrias de los hepatocitos (Fig. 18-2). Pasaremos ahora a discutir el destino de este amoníaco.

RESUMEN 18.1 Destinos metabólicos de los grupos amino

■ Una pequeña parte de la energía oxidativa en los humanos proviene del catabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos se obtienen en la degradación normal (reciclado) de las proteínas celulares, degradación de las proteínas ingeridas y degradación de las proteínas corporales en lugar de otras fuentes de combustible durante la inanición o en la diabetes mellitus no controlada.

■ Las proteínas ingeridas son degradadas por proteasas en el estómago e intestino delgado. La mayoría de las proteasas se sintetizan inicialmente en forma de zimógenos inactivos.

■ Una etapa temprana del catabolismo de los aminoácidos es la separación del grupo amino de su esqueleto carbonado. En la mayoría de casos el grupo amino se transfiere al α-cetoglutarato formando glutamato. Esta reacción de transaminación requiere el coenzima piridoxal fosfato.

■ El glutamato se transporta a las mitocondrias hepáticas, en donde la glutamato deshidrogenasa libera el grupo amino en forma de ión amonio (NH_4^+). El amoníaco formado en otros tejidos se transporta al hígado en forma del nitrógeno amídico de la glutamina o, en el transporte desde el músculo esquelético, como grupo amino de la alanina.

■ El piruvato producido por desaminación de la alanina en el hígado se convierte en glucosa, la cual se vuelve a transportar al músculo como parte del ciclo de la glucosa-alanina.

18.2 Excreción del nitrógeno y ciclo de la urea

Si no se reutilizan para la síntesis de nuevos aminoácidos u otros productos nitrogenados, los grupos amino se canalizan a un único producto final de excreción

(Fig. 18-10). La mayoría de especies acuáticas, tales como los peces óseos, excretan el nitrógeno amínico en forma de amoníaco por lo que se les llama animales **amonotélicos**. El amoníaco tóxico simplemente se diluye en el agua circundante. Los animales terrestres necesitan vías para la excreción del nitrógeno que minimicen tanto la toxicidad como la pérdida de agua. La mayoría de animales terrestres son **ureotélicos,** excretan el nitrógeno amínico en forma de urea; las aves y los reptiles son **uricotélicos**, excretan el nitrógeno amínico en forma de ácido úrico. (La ruta para la síntesis de ácido úrico se describe en la Figura 22-48). Las plantas reciclan virtualmente todos los grupos amino por lo que la excreción de nitrógeno sólo tiene lugar en circunstancias muy poco comunes.

En los organismos ureotélicos, el amoníaco depositado en las mitocondrias de los hepatocitos se convierte en urea mediante el **ciclo de la urea**. Esta ruta fue descubierta en 1932 por Hans Krebs (que más tarde también descubriría el ciclo del ácido cítrico) y un estudiante médico asociado, Kurt Henseleit. La producción de urea tiene lugar casi exclusivamente en el hígado y representa el destino de la mayor parte del amoníaco allí canalizado. La urea pasa al torrente sanguíneo y de ahí a los riñones y se excreta en la orina. La producción de urea constituirá ahora el centro de nuestra atención.

La urea se produce a partir de amoníaco en cinco pasos enzimáticos

El ciclo de la urea empieza en el interior de las mitocondrias del hígado, si bien tres de los pasos posteriores tienen lugar en el citosol; por tanto, el ciclo abarca dos compartimientos celulares (Fig. 18-10). El primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea proviene del amoníaco de la matriz mitocondrial, (NH_4^+ que es el resultado de las rutas descritas en la sección anterior). Parte del amoníaco también llega al hígado vía vena porta desde el intestino, en donde se produce por oxidación bacteriana de aminoácidos. Cualquiera que sea su origen, el NH_4^+ generado en las mitocondrias hepáticas se utiliza inmediatamente, junto con el CO_2 (en forma de HCO_3^-) producido por la respiración mitocondrial, para dar carbamil fosfato en la matriz **(Fig. 18-11a**; véase también la Fig. 18-10). Esta reacción dependiente de ATP está catalizada por la **carbamil fosfato sintetasa I**, un enzima regulador (véase más adelante). La forma mitocondrial del enzima es distinta de la forma citosólica (II) que tiene una función diferente en la biosíntesis de pirimidinas (Capítulo 22).

El carbamil fosfato, que funciona como un dador activado del grupo carbamilo, entra ahora en el ciclo de la urea, que consta de sólo cuatro pasos enzimáticos. En primer lugar, el carbamil fosfato cede su grupo carbamilo a la ornitina para formar citrulina y libera P_i (Fig. 18-10, paso ❶). La reacción está catalizada por la **ornitina transcarbamilasa**. La ornitina no es uno de los 20 aminoácidos comunes que se encuentran en las proteínas, pero es un intermediario clave en el metabolismo nitrogenado. Se sintetiza a partir del glutamato en una ruta de cinco pasos descrita en el Capítulo 22. La ornitina desempeña un papel similar al del oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico, aceptando material en cada vuelta del ciclo de la urea. La citrulina formada en el primer paso del ciclo de la urea pasa de la mitocondria al citosol.

El segundo grupo amino se introduce en los dos pasos siguientes. La fuente es aspartato generado en la mitocondria por transaminación y transportado al citosol. Una reacción de condensación entre el grupo amino del aspartato y el grupo ureido (carbonilo) de la citrulina forma argininosuccinato (paso ❷ en la Fig. 18-10). Esta reacción citosólica, catalizada por la **argininosuccinato sintetasa**, requiere ATP y tiene lugar a través de un intermedio citrulil-AMP (Fig. 18-11b). A continuación se corta el argininosuccinato por la **argininosuccinasa** (paso ❸ en la Fig. 18-10), para formar arginina libre y fumarato; este último se convierte en malato antes de entrar en la mitocondria y unirse a la reserva de intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Éste es el único paso reversible del ciclo de la urea. En la última reacción del ciclo de la urea (paso ❹), el enzima citosólico **arginasa** corta la arginina dando **urea** y ornitina. La ornitina se transporta a la mitocondria para iniciar otra vuelta del ciclo de la urea.

Tal como observamos en el Capítulo 16, los enzimas de muchas rutas metabólicas están agrupados en metabolones. El producto de un enzima se canaliza directamente al siguiente enzima de la vía. En el ciclo de la urea, los enzimas mitocondriales y citosólicos parecen estar agrupados de esta forma. La citrulina transportada al exterior de la mitocondria no se diluye en la reserva general de metabolitos del citosol sino que pasa directamente al sitio activo de la argininosuccinato sintetasa. Esta canalización entre enzimas continúa para el argininosuccinato, arginina y ornitina. Sólo se libera la urea a la reserva (pool) general de metabolitos del citosol.

Copy-Station

Los ciclos del ácido cítrico y de la urea pueden conectarse

Dado que el fumarato producido en la reacción de la argininosuccinasa es también un intermediario del ciclo del ácido cítrico, los ciclos están, en principio, interconectados en un proceso conocido como el "doble ciclo de Krebs" **(Fig. 18-12)**. Sin embargo, cada ciclo puede funcionar de manera independiente y la comunicación entre ellos depende del transporte de intermediarios clave entre la mitocondria y el citosol. Entre los transportadores principales de la membrana mitocondrial interna se encuentran el transportador de malato-α-cetoglutarato, el transportador de glutamato-aspartato y el transportador de glutamato-OH^-. En conjunto, estos transportadores facilitan el movimiento de malato y glutamato al interior de la matriz mitocondrial y el movimiento de aspartato y α-cetoglutarato hacia fuera al citosol.

Varios enzimas del ciclo del ácido cítrico, incluida la fumarasa (fumarato hidratasa) y la malato deshidrogenasa, también están presentes como isozimas en el citosol. No existe un transportador que mueva directamente el fumarato generado en la síntesis citosólica de arginina de nuevo hacia la matriz mitocondrial. Sin embargo, el fumarato puede convertirse en malato en el citosol. El fumarato y el malato pueden seguir siendo metabolizados en el citosol o se puede transportar el malato a las mitocondrias para su utilización en el ciclo del ácido cítrico. El aspartato formado en las mitocon-

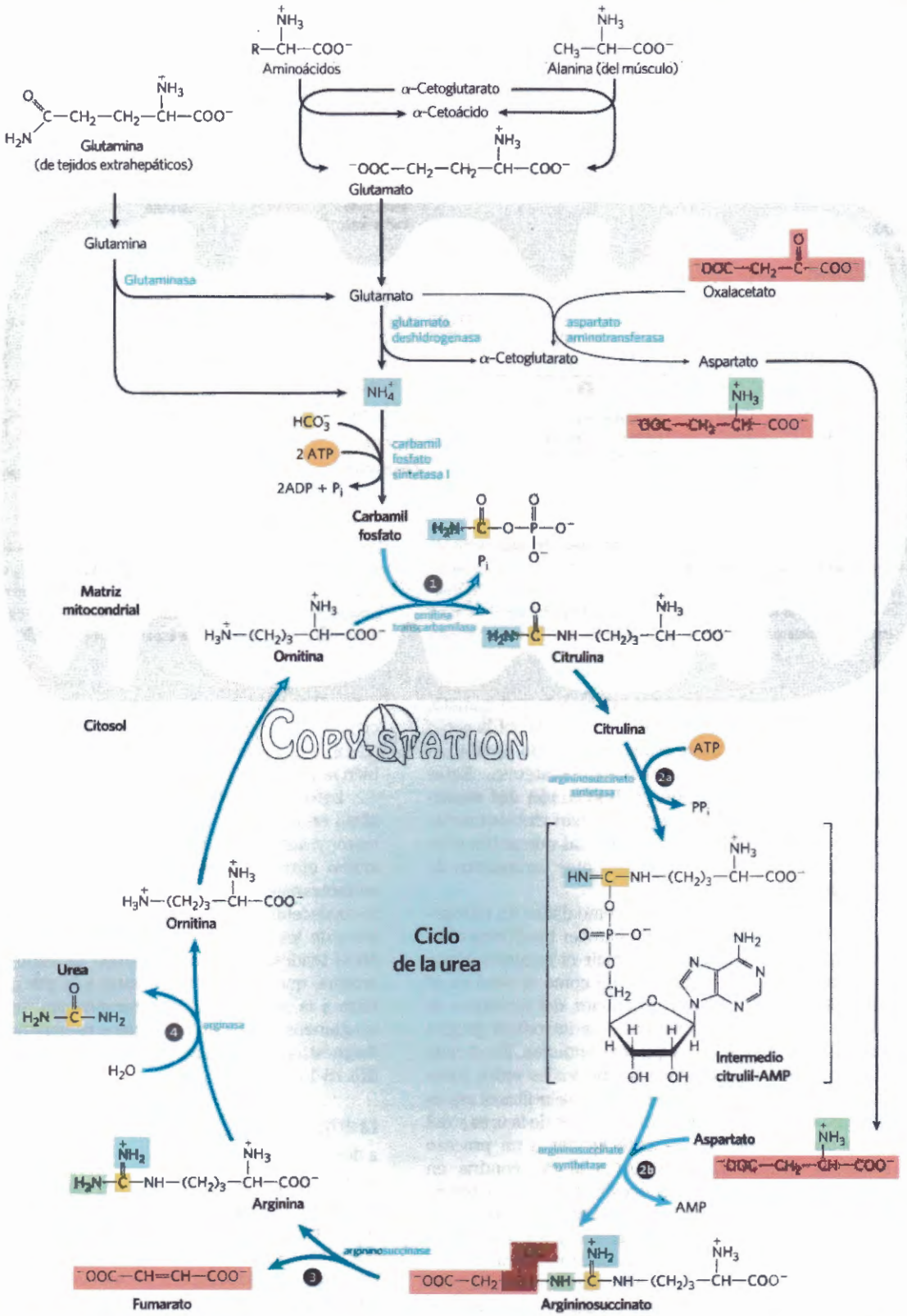


FIGURA 18-10 Ciclo de la urea y reacciones que introducen grupos amino en el mismo. Los enzimas que catalizan estas reacciones (nombrados en el texto) se distribuyen entre la matriz mitocondrial y el citosol. Un grupo amino entra en el ciclo de la urea en forma de carbamil fosfato formado en la matriz; el otro entra como aspartato, formado en la matriz por transaminación del oxalacetato y el glutamato, catalizada por la aspartato aminotransferasa. El ciclo de la urea consta de cuatro pasos: ❶ Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamil fosfato (entrada del primer grupo amino); la citrulina pasa al citosol. ❷ Formación de argininosuccinato a través de un intermedio citrulil-AMP (entrada del segundo grupo amino). ❸ Formación de arginina a partir del argininosuccinato; esta reacción libera fumarato que entra en el ciclo del ácido cítrico. ❹ Formación de urea; esta reacción también regenera la ornitina. Las vías mediante las que el NH_4^+ llega a la matriz mitocondrial de los hepatocitos se describieron en la Sección 18.1.

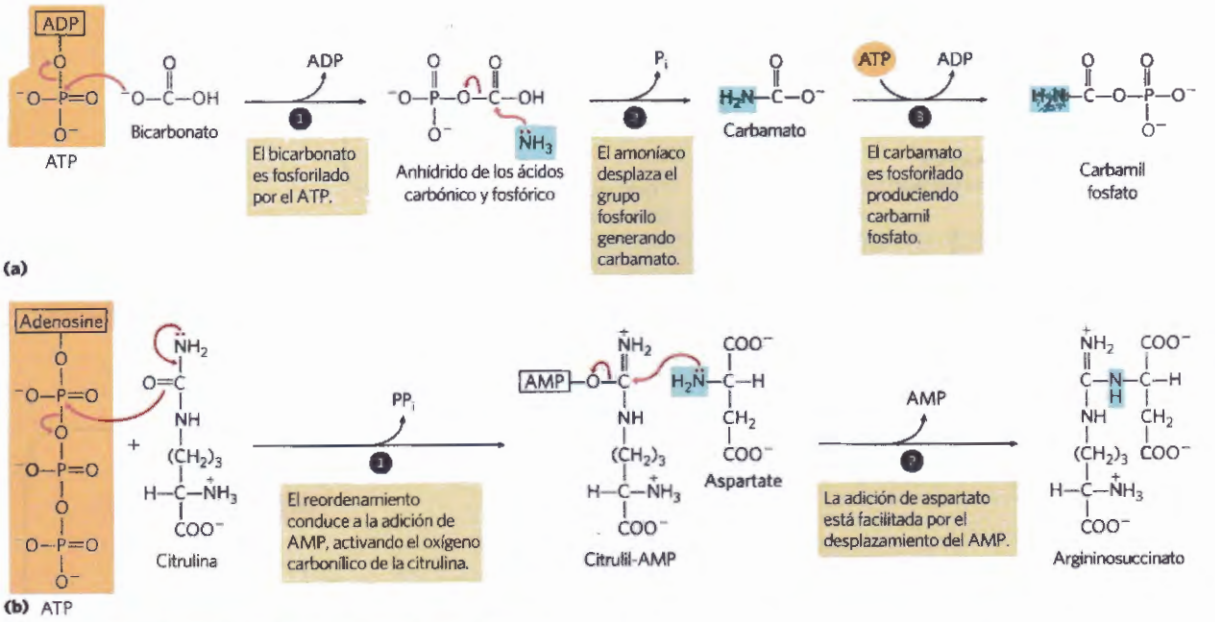


FIGURA DE MECANISMO 18-11 Reacciones de adquisición de nitrógeno en la síntesis de urea. Los nitrógenos de la urea se adquieren en dos reacciones que requieren ATP. **(a)** El primer nitrógeno del amoníaco entra en la reacción catalizada por la carbamil fosfato sintetasa I. Los grupos fosfato terminales de dos moléculas de ATP se utilizan para formar una molécula de carbamil fosfato. Dicho de otra forma, en esta reacción hay dos pasos de activación (❶ y ❸). **(b)** En la reacción catalizada por la argininosuccinato sintetasa, entra el segundo nitrógeno procedente del aspartato. La activación del oxígeno ureido de la citrulina en el paso ❶ prepara la adición de aspartato en el paso ❷.

drias por transaminación entre oxalacetato y glutamato, puede ser transportado al citosol, en donde actúa como dador de nitrógeno en la reacción del ciclo de la urea catalizada por la argininosuccinato sintetasa. Estas reacciones, que constituyen la **desviación del aspartato-argininosuccinato**, proporcionan vínculos metabólicos entre las rutas separadas por las que se transforman los grupos amino y los esqueletos carbonados de los aminoácidos.

La utilización del aspartato como dador de nitrógeno en el ciclo de la urea puede parecer una forma relativamente complicada de introducir el segundo grupo amino en la urea. No obstante, tal como se verá en el Capítulo 22 esta vía de incorporación del nitrógeno es una de las dos formas habituales de introducir grupos amino en las biomoléculas que los contienen. En el ciclo de la urea existen conexiones adicionales entre rutas que pueden ayudar a explicar por qué se utiliza el aspartato como dador de nitrógeno. Los ciclos de la urea y del ácido cítrico están fuertemente ligados a un proceso adicional que incorpora NADH a la mitocondria en forma de equivalentes de reducción. Tal como se describe en el próximo capítulo, el NADH producido en la glucólisis, oxidación de ácidos grasos y otros procesos no puede transportarse a través de la membrana mitocondrial interna. En lugar de ello se llevan a la mitocondria equivalentes de reducción mediante la conversión del oxalacetato en malato con NADH y el transporte del malato a la matriz mitocondrial vía el transportador de malato-α-cetoglutarato. Una vez en el interior de la mitocondria, el malato puede reconvertirse en oxalacetato con generación de NADH. El oxalacetato se convierte en aspartato en la matriz y se transporta fuera de la mitocondria por el transportador de aspartato-glutamato. Esta lanzadera de malato-aspartato completa otro ciclo que funciona para mantener el suministro de NADH a la mitocondria (véase la Fig. 18-12; véase también la Fig. 19-31).

Estos procesos requieren que se mantenga un equilibrio en el citosol entre las concentraciones de glutamato y aspartato. El enzima que transfiere grupos amino entre estos aminoácidos clave es la aspartato aminotransferasa, AAT (también llamada glutamato-oxalacetato transaminasa, GOT). Este enzima es unos de los enzimas más activos en los hepatocitos y otros tejidos. Cuando se produce un daño tisular este enzima, que se mide fácilmente, a la par que otros se filtra a la sangre. Así, la determinación de los niveles sanguíneos de enzimas hepáticos es importante para el diagnóstico de diversas enfermedades (véase el Recuadro 18-1).

La actividad del ciclo de la urea está regulada a dos niveles

El flujo de nitrógeno a través del ciclo de la urea varía de un individuo a otro con la dieta. Cuando la dieta es mayoritariamente proteína, la utilización de los esqueletos carbonados de los aminoácidos como combustible da lugar a la producción de mucha urea a partir del exceso de grupos amino. Durante la inanición prolongada, en la que la degradación de proteína muscular empieza a suministrar gran parte de la energía metabólica del organismo, también aumenta de manera sustancial la producción de urea.

Estos cambios en la demanda de actividad del ciclo de la urea se consiguen a largo plazo mediante la regulación de las velocidades de síntesis de los cuatro enzimas del ciclo de la urea y de la carbamil fosfato sinteta-

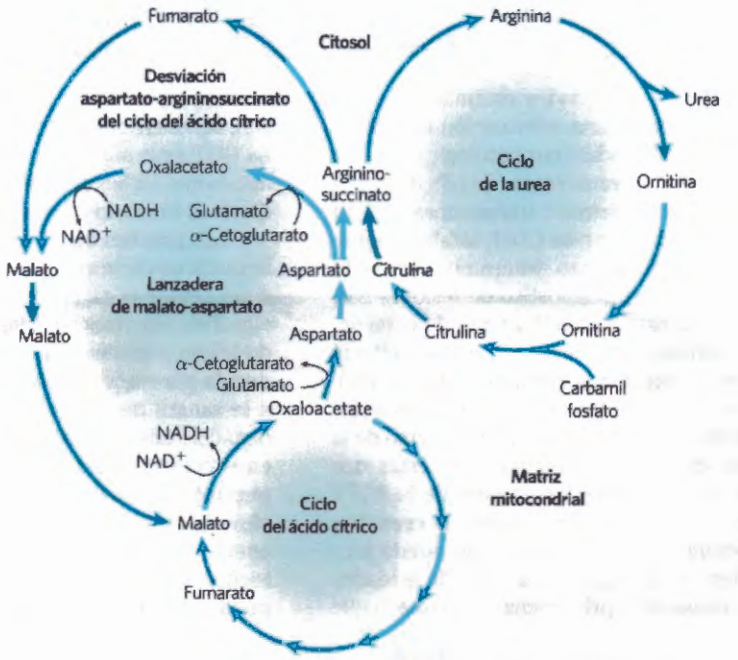


FIGURA 18-12 Conexiones entre el ciclo de la urea y el ciclo del ácido cítrico. Los ciclos interconectados han sido denominados el "doble ciclo (biciclo) de Krebs". Las vías que conectan los ciclos del ácido cítrico y de la urea se denomina desviación del aspartato-argininosuccinato. Estas rutas conectan de forma efectiva los destinos de los grupos amino y los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Las interconexiones son muy complejas. Por ejemplo, algunos enzimas del ciclo del ácido cítrico, tales como la fumarasa y la malato deshidrogenasa, tienen tanto isozimas mitocondriales como citosólicos. El fumarato producido en el citosol, ya sea por el ciclo de la urea, la biosíntesis de purinas u otros procesos, puede convertirse en malato citosólico, que se utiliza en el citosol o se transporta a la mitocondria para entrar en el ciclo del ácido cítrico. Estos procesos están, además, interconectados con la lanzadera del malato-aspartato, un conjunto de reacciones que introducen equivalentes de reducción en la mitocondria (véase la Figura 19-31). Estos diferentes ciclos y procesos basan su acción en un número limitado de transportadores de la membrana mitocondrial interna.

sa I en el hígado. Los cinco enzimas se sintetizan a velocidades más elevadas durante la inanición o en los animales con dietas muy ricas en proteínas que en animales bien alimentados con dietas que contienen principalmente glúcidos y grasas. Los animales con dietas carentes de proteínas producen niveles más bajos de los enzimas del ciclo de la urea.

En una escala de tiempo más corta, la regulación alostérica de al menos un enzima clave ajusta el flujo a través del ciclo de la urea. El primer enzima de la ruta, la carbamil fosfato sintetasa I, está activado alostéricamente por el ***N*-acetilglutamato**, que se sintetiza a partir de acetil-CoA y glutamato por la ***N*-acetilglutamato sintasa (Fig. 18-13)**. Este enzima cataliza el primer paso de la síntesis de novo de la arginina a partir de glutamato en plantas y microorganismos (véase la Fig. 22-12), pero en los mamíferos la actividad *N*-acetilglutamato sintasa en el hígado tiene una función puramente reguladora (los mamíferos carecen del resto de enzimas necesarios para convertir el glutamato en arginina). Los niveles de estado-estacionario del *N*-acetilglutamato vienen determinados por las concentraciones de glutamato y de acetil-CoA (los sustratos de la *N*-acetilglutamato sintasa) y de arginina (un activador de la *N*-acetilglutamato sintasa y, por consiguiente, un activador del ciclo de la urea).

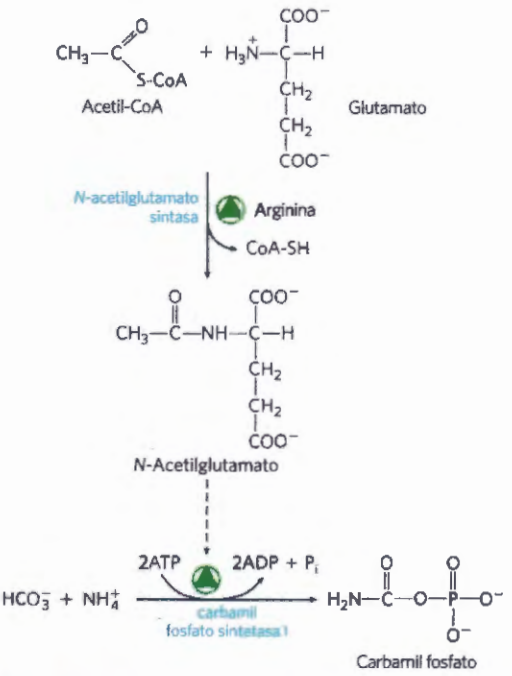


FIGURA 18-13 Síntesis de *N*-acetilglutamato y su activación de la carbamil fosfato sintetasa I.

RECUADRO 18-1 MEDICINA Determinación de lesiones tisulares

El análisis de ciertas actividades enzimáticas en el suero sanguíneo proporciona información diagnóstica útil sobre diversas condiciones patológicas.

La alanina aminotransferasa (ALT; también denominada glutamato-piruvato transaminasa, GPT) y la aspartato aminotransferasa (AAT; también denominada glutamato-oxalacetato transaminasa, GOT) son importantes para el diagnóstico de lesiones cardíacas y hepáticas, causadas por ataque de corazón, toxicidad de fármacos, o infección. Tras un ataque al corazón, diversos enzimas, incluidos estas aminotransferasas, escapan de las células cardíacas lesionadas al torrente circulatorio. La determinación de la concentración en el suero sanguíneo de estas dos aminotransferasas mediante las pruebas de la SGPT y SGOT (S de suero), y de otro enzima, la **creatina quinasa**, mediante la prueba de la SCK, puede proporcionar información sobre la gravedad de la lesión. La creatina quinasa es el primer enzima cardíaco que aparece en la sangre después de un ataque de corazón; también desaparece rápidamente de la sangre. La GOT es la siguiente en aparecer y la GPT lo hace más tarde. La lactato deshidrogenasa también escapa desde el músculo cardíaco lesionado o anaeróbico.

Las pruebas de la SGOT y la SGPT también son importantes en medicina del trabajo, para determinar si las personas expuestas a tetracloruro de carbono, cloroformo u otros disolventes industriales, han sufrido lesión hepática. La degeneración del hígado producida por estos disolventes va acompañada del paso a la sangre de diversos enzimas de los hepatocitos dañados. Las aminotransferasas son de gran utilidad en el control de las personas expuestas a estos compuestos químicos, debido a que tienen una actividad elevada en el hígado por lo que es probable que se encuentren entre las proteínas vertidas por los hepatocitos dañados; además, su actividad en la sangre se puede detectar a muy bajas concentraciones.

Las interconexiones entre rutas reducen el coste energético de la síntesis de urea

Si se considera el ciclo de la urea aisladamente, la síntesis de una molécula de urea requiere cuatro grupos fosfato de alta energía (Fig. 18-10). Se requieren dos moléculas de ATP para producir el carbamil fosfato y un ATP para producir argininosuccinato. Este último ATP sufre una escisión del pirofosfato dando AMP y PP_i, que es hidrolizado a dos P_i. La ecuación global del ciclo de la urea es

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + 3\ ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow \text{urea} + 2\ ADP^{3-} + 4P_i^{2-} + AMP^{2-} + 2H^+$$

Sin embargo, este coste aparente se mejora por las interconexiones entre rutas antes descritas. El fumarato generado en el ciclo de la urea se convierte en malato que se transporta a la mitocondria (Fig. 18-12). En la matriz mitocondrial se genera NADH en la reacción de la malato deshidrogenasa. Cada molécula de NADH puede generar hasta 2,5 ATP durante la respiración mitocondrial (Capítulo 19), lo que reduce enormemente el coste energético global de la síntesis de urea.

Defectos genéticos en el ciclo de la urea pueden ser letales

Las personas con defectos genéticos en cualquiera de los enzimas que intervienen en la formación de urea no pueden tolerar una dieta rica en proteínas. Los aminoácidos ingeridos en exceso a los requerimientos diarios mínimos para la síntesis de proteínas se desaminan en el hígado, produciendo amoníaco libre que no puede ser convertido en urea y exportado a la sangre y, tal como hemos visto, el amoníaco es muy tóxico. La ausencia de un enzima del ciclo de la urea puede producir hiperamonemia o la acumulación de uno o más intermediarios del ciclo de la urea, según cual sea el enzima ausente. Dado que la mayoría de pasos del ciclo de la urea son irreversibles, puede, a menudo, identificarse la actividad enzimática ausente mediante la determinación de qué intermediario del ciclo se encuentra a una concentración especialmente elevada en la sangre y/o en la orina. Aunque la degradación de aminoácidos puede tener consecuencias graves para la salud en individuos con deficiencias en el ciclo de la urea, la opción de una dieta carente de proteínas no es satisfactoria. Los humanos son incapaces de sintetizar la mitad de los 20 aminoácidos estándar, y estos **aminoácidos esenciales** (Tabla 18-1) se han de suministrar en la dieta.

A los pacientes con defectos en el ciclo de la urea se les aplican diversos tratamientos. La administración cuidadosa de los ácidos aromáticos benzoato o fenilbu-

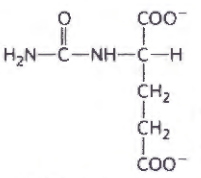
TABLA 18-1 Aminoácidos no esenciales y esenciales para humanos y rata albina

No esenciales	Condicionalmente esenciales[a]	Esenciales
Alanina	Arginina	Histidina
Asparagina	Cisteína	Isoleucina
Aspartato	Glutamina	Leucina
Glutamato	Glicina	Lisina
Serina	Prolina	Metionina
	Tirosina	Fenilalanina
		Treonina
		Triptófano
		Valina

[a]Parcialmente esencial en animales jóvenes en crecimiento y/o durante una enfermedad.

tirato en la dieta puede ayudar a reducir los niveles de amoníaco en la sangre. El benzoato se convierte en benzoil-CoA, que se combina con la glicina formando hipurato (**Fig. 18-14**, izquierda). La glicina utilizada en esta reacción debe ser regenerada, y así el amoníaco se utiliza en la reacción de la glicina sintasa. El fenilbutirato se convierte en fenilacetato por β-oxidación. El fenilacetato se convierte entonces en fenilacetil-CoA que se combina con glutamina para formar fenilacetilglutamina (Fig. 18-14, derecha). La eliminación consiguiente de glutamina desencadena su síntesis adicional por la glutamina sintasa (véase la Ec. 22-1) en una reacción que capta amoníaco. Tanto el hipurato como la fenilacetilglutamina son compuestos no tóxicos que se excretan en la orina. Aunque las rutas mostradas en la Figura 18-14 sólo realizan contribuciones minoritarias al metabolismo normal, son importantes cuando se ingieren ácidos aromáticos.

Otras terapias son más específicas de una determinada deficiencia enzimática. La deficiencia de *N*-acetilglutamato sintasa tiene como resultado la ausencia del activador normal de la carbamil fosfato sintetasa I (Fig. 18-13). Este estado puede tratarse administrando carbamil glutamato, un análogo del *N*-acetilglutamato que es efectivo como activador de la carbamil fosfato sintetasa I.



COPY-STATION

Para las deficiencias en ornitina transcarbamilasa, argininosuccinato sintetasa, y argininosuccinasa, es útil suplementar la dieta con arginina. Muchos de estos tratamientos deben ir acompañados de un control estricto de la dieta y de suplementos de los aminoácidos esenciales. En los pocos casos de deficiencia de arginasa, la arginina, el sustrato del enzima defectuoso, debe eliminarse de la dieta. ■

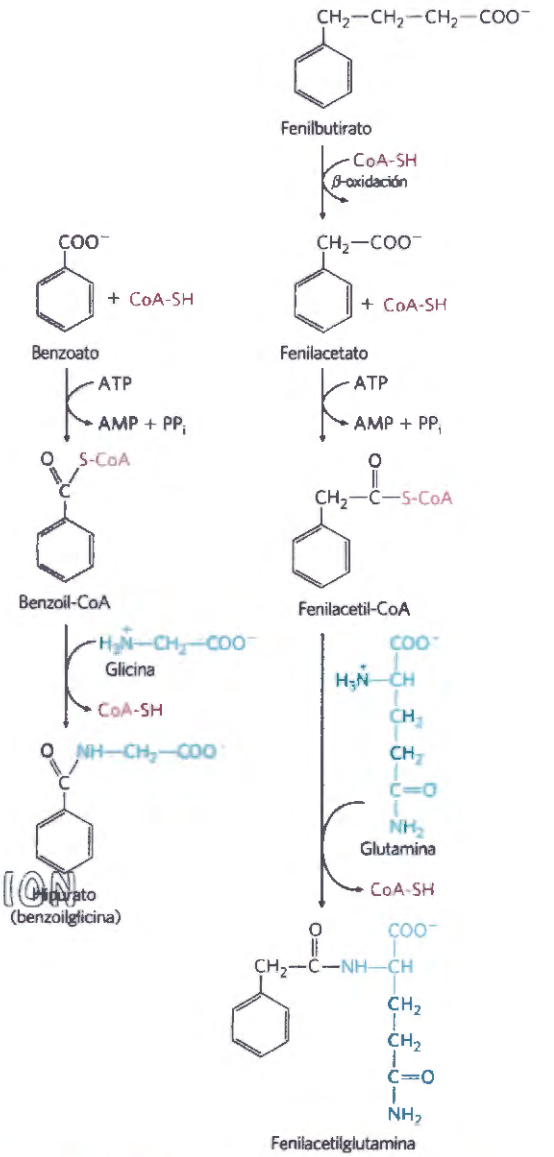


FIGURA 18-14 Tratamiento de carencias de enzimas del ciclo de la urea. Los ácidos aromáticos benzoato y fenilbutirato administrados en la dieta se metabolizan y combinan con glicina y glutamina, respectivamente, y los productos se excretan en la orina. La síntesis posterior de glicina y glutamina para reponer las reservas de estos intermediarios elimina amoníaco de la sangre.

RESUMEN 18.2 Excreción de nitrógeno y ciclo de la urea

■ El amoníaco es muy tóxico para los tejidos animales. En el ciclo de la urea, la ornitina se combina con el amoníaco, en forma de carbamil fosfato, para formar citrulina. Un segundo grupo amino se transfiere a la citrulina desde el aspartato para formar la arginina, el precursor inmediato de la urea. La arginasa cataliza la hidrólisis de la arginina a urea y ornitina; la ornitina se regenera en cada vuelta del ciclo.

■ El ciclo de la urea tiene como resultado una conversión neta de oxalacetato en fumarato, ambos intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Los dos ciclos están, por tanto, interconectados.

■ La actividad del ciclo de la urea está regulada al nivel de la síntesis de enzimas y por regulación alostérica del enzima que cataliza la formación de carbamil fosfato.

18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos

El catabolismo de los aminoácidos normalmente sólo representan del 10 al 15% de la producción energética del cuerpo humano; estas rutas no son ni mucho menos tan activas como la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Además, el flujo a través de estas rutas varía mucho, dependiendo del equilibrio entre los requerimientos para procesos biosintéticos y la disponibilidad de un aminoácido determinado. Las 20 rutas catabólicas convergen para formar sólo seis productos principales, que entran todos ellos en el ciclo del ácido cítrico (**Fig. 18-15**). De ahí los esqueletos carbonados se pueden desviar bacia la gluco-

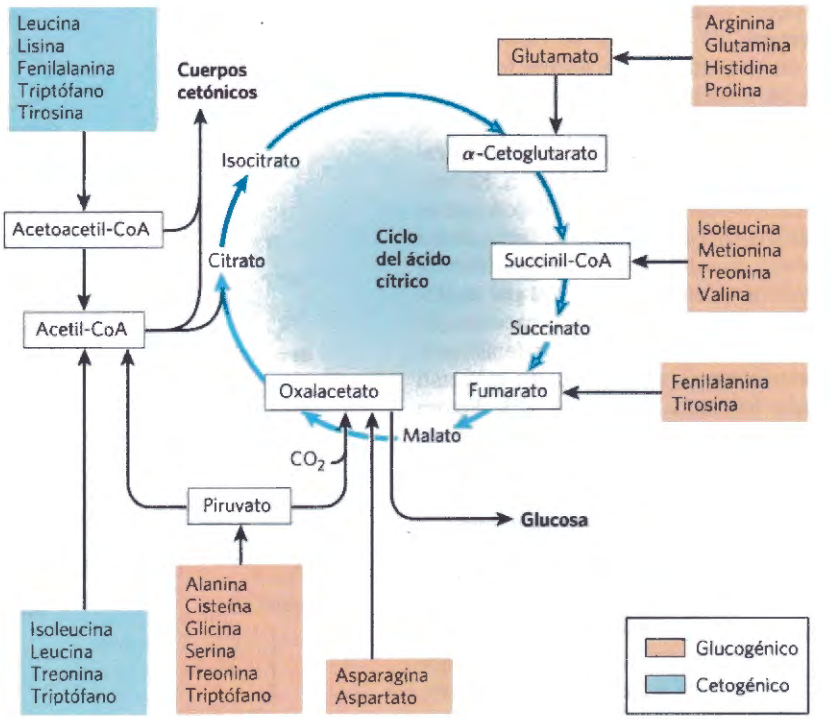


FIGURA 18-15 Resumen del catabolismo de los aminoácidos Los aminoácidos se agrupan según su producto final de degradación principal. Algunos aminoácidos se mencionan más de una vez puesto que diferentes partes de su esqueleto carbonado se degradan a diferentes productos finales. La figura muestra las rutas catabólicas principales en animales vertebrados, si bien existen pequeñas variaciones entre especies diferentes (véanse las Figs. 18-19, 18-27) pudiendo variar la importancia de cada ruta en función del organismo y de las condiciones metabólicas. Los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos también quedan delineados en la figura por el color del sombreado. Observe que hay cinco aminoácidos que son a la vez glucogénicos y cetogénicos. Los aminoácidos que se degradan a piruvato también son potencialmente cetogénicos. Sólo dos aminoácidos, leucina y lisina, son exclusivamente cetogénicos.

COPY STATION

neogénesis o la cetogénesis o se pueden oxidar completamente a CO_2 y H_2O.

Los esqueletos carbonados de siete de los aminoácidos se degradan, total o parcialmente, dando en último término acetil-CoA. Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato, cuatro en succinil-CoA, dos en fumarato y dos en oxalacetato. Partes, o la totalidad, de seis aminoácidos se convierten en piruvato que puede convertirse en acetil-CoA o en oxalacetato. Las rutas individuales de los 20 aminoácidos se resumen más adelante por medio de diagramas de flujo que conducen a un punto específico de entrada en el ciclo del ácido cítrico. En estos diagramas se muestran en color los átomos de carbono que entran en el ciclo del ácido cítrico. Observe que algunos aminoácidos aparecen más de una vez lo que es reflejo del hecho que partes diferentes de sus esqueletos carbonados tienen destinos diferentes. En lugar de examinar cada paso de cada ruta del catabolismo de los aminoácidos, se escogerán para una especial discusión algunas reacciones enzimáticas que son especialmente interesantes por sus mecanismos o por su significación médica.

Algunos aminoácidos se convierten en glucosa, otros en cuerpos cetónicos

Los siete aminoácidos que se degradan total o parcialmente a acetoacetil-CoA y/o acetil-CoA (fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina, triptófano, treonina y lisina) pueden dar cuerpos cetónicos en el hígado, en donde el acetoacetil-CoA se convierte en acetoacetato y a continuación en acetona y β-hidroxibutirato (véase la Fig. 17-18). Estos son los aminoácidos **cetogénicos** (Fig. 18-15). Su capacidad para producir cuerpos cetónicos es especialmente evidente en la diabetes mellitus no controlada, en la que el hígado produce grandes cantidades de cuerpos cetónicos, tanto a partir de ácidos grasos como de los aminoácidos cetogénicos.

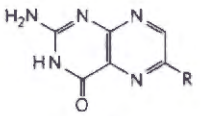
Los aminoácidos que son degradados a piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y/u oxalacetato se pueden convertir en glucosa y glucógeno por las vías descritas en los Capítulo 14 y 15. Éstos son los aminoácidos **glucogénicos**. La división entre aminoácidos cetogénicos y glucogénicos no es absoluta; cinco aminoácidos (triptófano, fenilalanina, tirosina, treonina e isoleucina) son a la vez cetogénicos y glucogénicos. El catabolismo de los aminoácidos es especialmente crítico para la supervivencia de animales con dietas ricas en proteínas o durante la inanición. La leucina es un aminoácido exclusivamente cetogénico que es muy abundante en las proteínas. Su degradación contribuye de manera sustancial a la cetosis en condiciones de inanición.

Varios cofactores enzimáticos tienen papeles importantes en el catabolismo de los aminoácidos

En las rutas catabólicas de los aminoácidos tienen lugar diversos reordenamientos químicos interesantes. Es útil iniciar el estudio de estas rutas observando las clases de

reacciones que se repiten y presentando sus cofactores enzimáticos. Ya hemos considerado una clase importante: las reacciones de transaminación que requieren piridoxal fosfato. Otro tipo común de reacción en el catabolismo de los aminoácidos es la transferencia de grupos monocarbonados, en que interviene normalmente uno de los tres cofactores siguientes: biotina, tetrahidrofolato o *S*-adenosilmetionina **(Fig. 18-16)**. Estos cofactores transfieren grupos monocarbonados en diferentes estados de oxidación: la biotina transfiere carbono en su forma más oxidada, CO_2, (véase la Fig. 14-19); el tetrahidrofolato transfiere grupos monocarbonados en estados de oxidación intermedios y algunas veces como grupo metilo; y la *S*-adenosilmetionina transfiere grupos metilo, que constituyen el estado más reducido del carbono. Estos dos últimos cofactores son especialmente importantes en el metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos.

El **tetrahidrofolato (H_4 folato),** sintetizado en bacterias consta de una pterina sustituida (6-metilpterina), *p*-aminobenzoato y glutamato (Figura 18-16).



Pterina

La forma oxidada, el folato, es una vitamina para los mamíferos y se convierte en dos pasos en tetrahidrofolato por acción del enzima dihidrofolato reductasa. El grupo monocarbonado que experimenta la transferencia, en cualquiera de tres estados de oxidación, está unido al N-5, al N-10 o a ambos. La forma más reducida del cofactor transporta un grupo metilo, una forma más oxidada transporta un grupo metileno y las formas más oxidadas un grupo metenilo, formilo o formimino **(Fig. 18-17)**. La mayoría de las formas del tetrahidrofolato son interconvertibles y actúan como dadores de unidades monocarbonadas en diversas reacciones metabólicas. La fuente principal de unidades monocarbonadas para el tetrahidrofolato es el carbono eliminado en la conversión de serina en glicina que produce N^5, N^{10}-metilenotetrahidrofolato.

Aunque el tetrahidrofolato puede transportar un grupo metilo en el N-5, el potencial de transferencia de este grupo metilo es insuficiente para la mayoría de reacciones biosintéticas. La ***S*-adenosilmetionina (adoMet)** es el cofactor preferido para la transferencia biológica de grupos metilo. Se sintetiza a partir de ATP y metionina por acción de la **metionina adenosil transferasa** (**Fig. 18-18**, paso ❶). Esta reacción es poco común ya que el átomo de azufre nucleofílico de la metionina ataca el carbono 5' de la porción ribosa del ATP, en lugar de atacar uno de los átomos de fósforo. Se libera trifosfato que se escinde a P_i y PP_i en el enzima y, posteriormente, el PP_i es escindido por la pirofosfato inorgánico hidrolasa, de modo que en esta reacción se rompen tres enlaces, entre ellos dos de grupos fosfato de alta energía. La otra única reacción conocida en la que se desplaza trifosfato del ATP tiene lugar en la síntesis del coenzima B_{12} (véase el Recuadro 17-2, Fig. 3).

La *S*-adenosilmetionina es un potente agente alquilante debido a su ión sulfonio desestabilizante. El grupo metilo está sujeto al ataque de nucleófilos y es unas 1.000 veces más reactivo que el grupo metilo del N^5-metiltetrahidrofolato.

La transferencia del grupo metilo desde la S-adenosilmetionina a un aceptor produce ***S*-adenosilhomocisteína** (Fig. 18-18, paso ❷), que a continuación se rompe dando homocisteína y adenosina (paso ❸). La metionina se regenera por transferencia de un grupo metilo a la homocisteína en una reacción catalizada por la metionina sintasa (paso ❹), y la metionina se reconvierte en *S*-adenosilmetionina para completar un ciclo del metilo activado.

Una forma de la metionina sintasa frecuente en bacterias utiliza N^5-metiltetrahidrofolato como dador de metilo. Otra forma del enzima presente en algunas bacterias y mamíferos utiliza N^5-metiltetrahidrofolato pero el grupo metilo se transfiere primero a la cobalamina, procedente del coenzima B_{12}, y se forma metilcobalamina que es el dador de metilo en la formación de metionina. Esta reacción y el reordenamiento del l-metilmalonil-CoA a succinil-CoA (véase el Recuadro 17-2, Fig. 1a) son las únicas reacciones dependientes de coenzima B_{12} que se conocen en los mamíferos.

Las vitaminas B_{12} y folato están muy relacionadas en estas rutas metabólicas. La enfermedad por carencia de B_{12}, la **anemia perniciosa** es rara y sólo se observa en individuos que tienen un defecto en las rutas

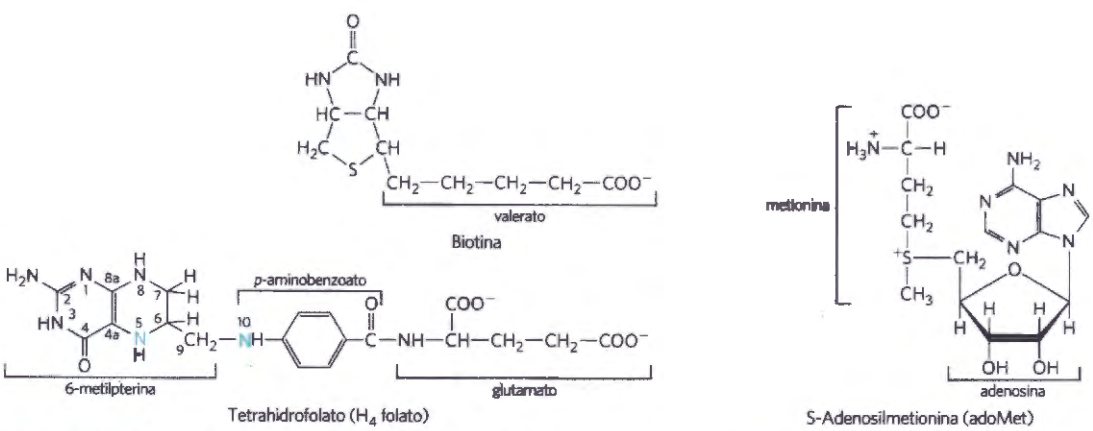
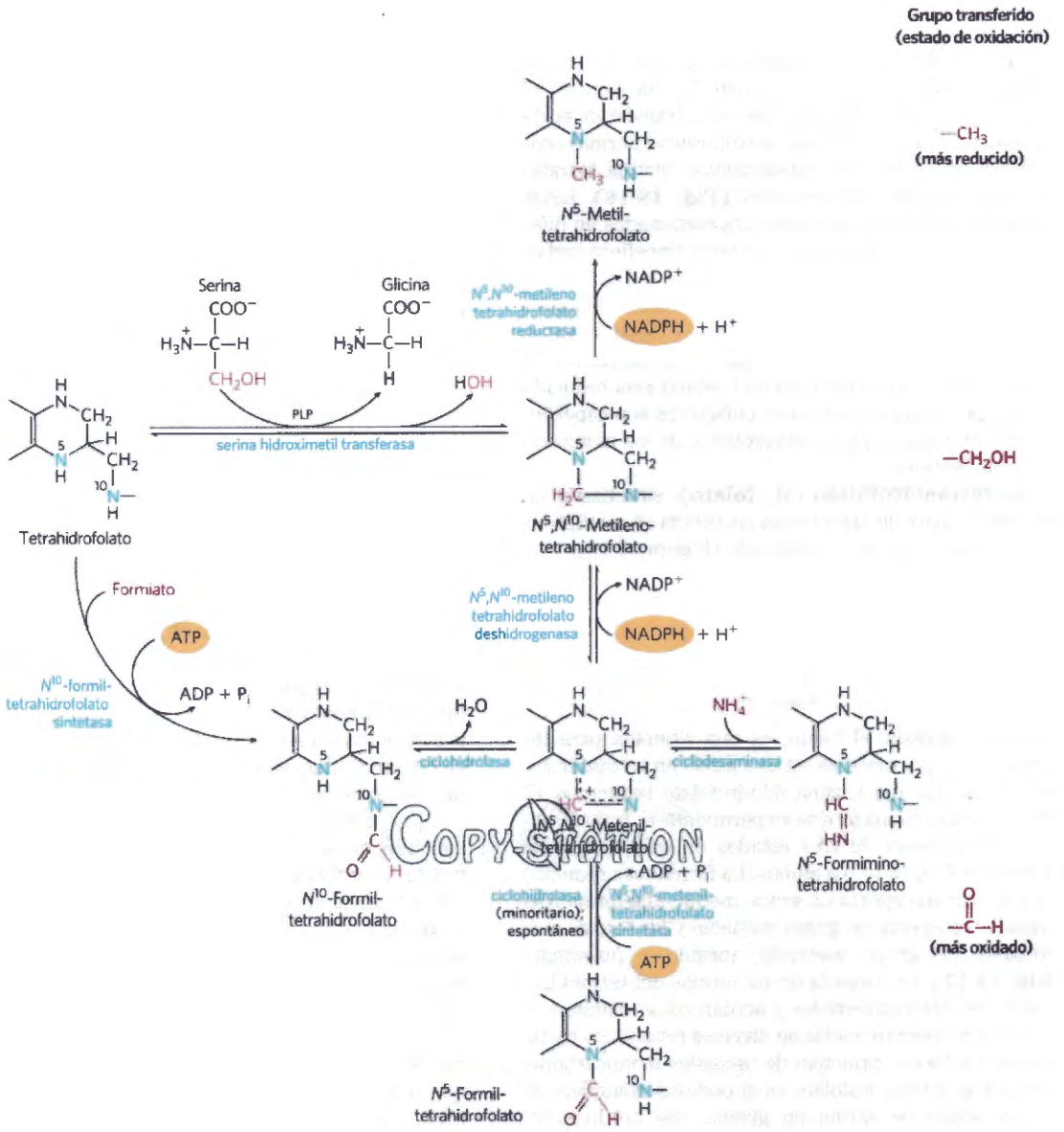


FIGURA 18-16 Algunos cofactores enzimáticos importantes en las reacciones de transferencia de grupos monocarbonados. Los átomos de nitrógeno a los que se unen los grupos monocarbonados en el tetrahidrofolato se muestran en azul.



COPY STATION

FIGURA 18-17 Conversiones de unidades monocarbonadas en el tetrahidrofolato. Las diferentes especies moleculares se agrupan según sus estados de oxidación, con la más reducida en la parte superior y la más oxidada en la parte inferior. Todas las especies incluidas dentro de un recuadro sombreado tienen el mismo estado de oxidación. La conversión de N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato a N^5-metiltetrahidrofolato es prácticamente irreversible. La transferencia enzimática de grupos formilo, tal como tiene lugar en la síntesis de purinas, (véase la Fig. 22-35) y en la formación de formilmetionina en bacterias (Capítulo 27) utiliza generalmente N^{10}-formiltetrahidrofolato en lugar de N^5-formiltetrahidrofolato. La segunda forma es significativamente más estable y, por tanto, un dador más débil de grupos formilo. El N^5-formiltetrahidrofolato es un producto secundario minoritario de la reacción de la ciclohidrolasa y también puede formarse de manera espontánea. La conversión de N^5-formitetrahidrofolato en N^5,N^{10}-meteniltetrahidrofolato requiere ATP debido a su equilibrio que, de otro modo, sería desfavorable. Observe que el N^5-formiminotetrahidrofolato proviene de la histidina según una ruta que se muestra en la Fig. 18-26.

de absorción intestinal de esta vitamina (véase el Recuadro 17-2) o en vegetarianos estrictos (la B_{12} no se encuentra en las plantas). Esta enfermedad progresa lentamente ya que sólo se requieren pequeñas cantidades de vitamina B_{12} y los depósitos de B_{12} en el hígado pueden durar de tres a cinco años. Los síntomas no sólo incluyen la anemia sino también diversos trastornos neurológicos.

La anemia puede atribuirse a la reacción de la metionina sintasa. Tal como se ha dicho, el grupo metilo de la metilcobalamina proviene del N^5-metiltetrahidrofolato, siendo ésta la única reacción en los mamíferos que utiliza el N^5-metiltetrahidrofolato. Como que la reacción que convierte la forma N^5,N^{10}-metileno en la forma N^5-metilo del tetrahidrofolato es irreversible (Fig. 18-17), si el coenzima B_{12} no está disponible para la síntesis de metilcobalamina, entonces los folatos metabólicos quedan atrapados en la forma N^5-metilo. La anemia asociada con la carencia de vitamina B_{12} se denomina **anemia megaloblástica**. Se manifiesta con una disminución en la

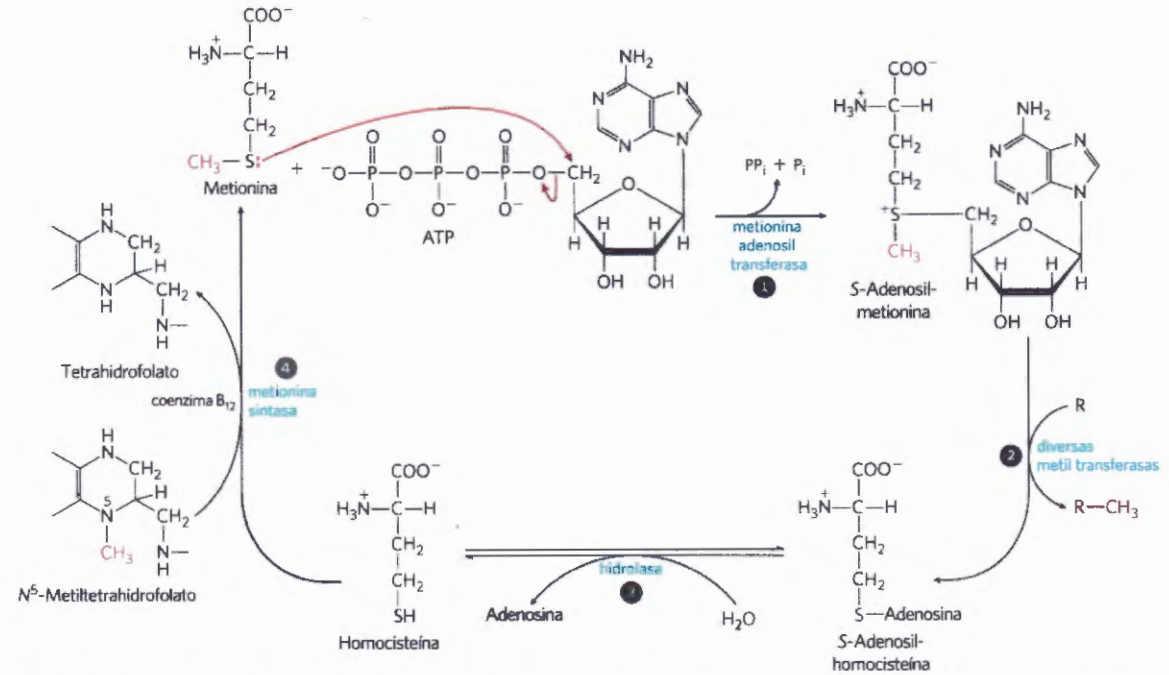


FIGURA 18-18 Síntesis de metionina y de *S*-adenosilmetionina en un ciclo del metilo activado. Los pasos se describen en el texto. En la reacción de la metionina sintasa (paso 4) el grupo metilo se transfiere a la cobalamina formando metilcobalamina que, a su vez, es el dador de metilo en la formación de metionina. La *S*-adenosilmetionina, que tiene un azufre cargado positivamente (siendo por tanto un ión sulfonio), es un agente metilante potente en diversas reacciones biosintéticas. El aceptor de grupo metilo (paso 2) se designa como R.

producción de eritrocitos maduros (glóbulos rojos de la sangre) y la aparición en la médula ósea de células precursoras inmaduras o **megaloblastos**. Los eritrocitos son reemplazados gradualmente en la sangre por cantidades menores de eritrocitos más grandes denominados **macrocitos**. El defecto en el desarrollo de los eritrocitos es una consecuencia directa de la desaparición del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato que es necesario para la síntesis de nucleótidos de timidina requeridos en la síntesis de DNA (véase el Capítulo 22). La carencia de folato, en la que han desaparecido todas las formas de tetrahidrofolato, también produce anemia debido básicamente a las mismas razones. Los síntomas de anemia en la carencia de vitamina B_{12} pueden aliviarse administrando vitamina B_{12} o folato.

No obstante, es peligroso tratar la anemia perniciosa solamente con suplementos de folato, ya que continuarán progresando los síntomas neurológicos de la carencia de B_{12}. Estos síntomas no proceden del defecto en la reacción de la metionina sintasa, sino que la metilmalonil-CoA mutasa defectuosa (véase el Recuadro 17-2 y la Fig. 17-12) produce una acumulación de ácidos grasos inusuales de cadena impar en las membranas neuronales. La anemia asociada con la carencia de folato se trata a menudo administrando tanto folato como vitamina B_{12}, al menos hasta que se ha determinado sin ambigüedad la causa metabólica de la anemia. El diagnóstico precoz de la carencia de B_{12} es importante porque algunos de los trastornos neurológicos pueden ser irreversibles.

La carencia de folato también disminuye la disponibilidad del N^5-metiltetrahidrofolato necesario para la función de la metionina sintasa. Esto lleva a un incremento de la concentración de homocisteína en sangre, situación asociada con enfermedades cardíacas, hipertensión y embolia. Los niveles elevados de homocisteína pueden ser responsables del 10% de todos los casos de enfermedad cardíaca. La enfermedad se trata con suplementos de folato. ■

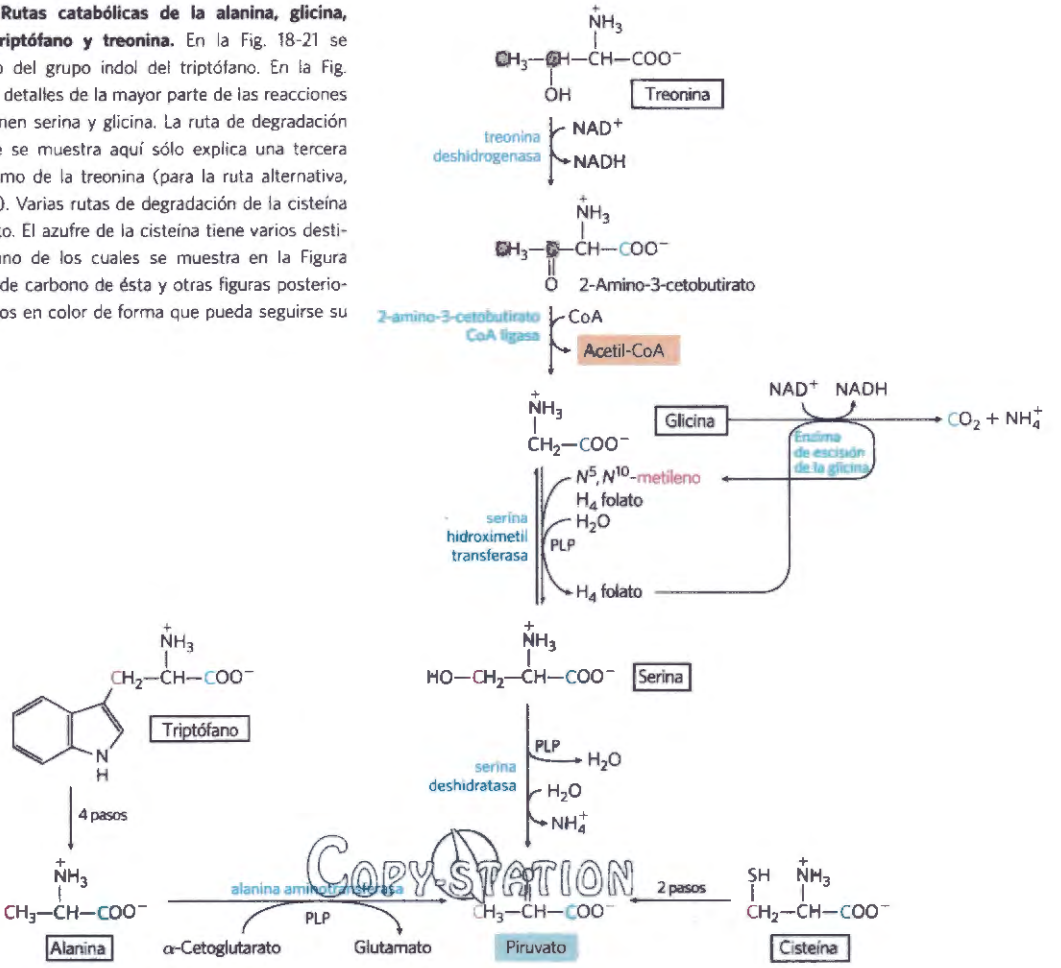
La **tetrahidrobiopterina**, otro cofactor del catabolismo de aminoácidos, es similar a la porción pterina del tetrahidrofolato, pero no interviene en la transferencia de grupos monocarbonados; en lugar de ello, participa en reacciones de oxidación. Consideraremos su modo de acción cuando expliquemos la degradación de la fenilalanina (véase la Fig. 18-24).

Seis aminoácidos se degradan a piruvato

Los esqueletos carbonados de seis aminoácidos se convierten, total o parcialmente, en piruvato. El piruvato puede convertirse, a continuación, en acetil-CoA y en último término oxidado vía ciclo del ácido cítrico, o en oxalacetato y desviado a la gluconeogénesis. Los seis aminoácidos son alanina, triptófano, cisteína, serina, glicina y treonina **(Fig. 18-19)**. La **alanina** da piruvato directamente al transaminarse con α-cetoglutarato y la cadena lateral del **triptófano** se corta dando alanina y, por tanto, piruvato. La **cisteína** se convierte en piruvato en dos pasos; uno elimina el átomo de azufre y el otro es una transaminación. La **serina** se convierte en piruvato por acción de la serina deshidratasa. Tanto los grupos β-hidroxilo como α-amino de la serina se eliminan en esta única reacción dependiente de piridoxal fosfato **(Fig. 18-20a)**.

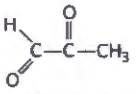
La **glicina** se degrada mediante tres rutas, de las que sólo una lleva a piruvato. La glicina se convierte en

FIGURA 18-19 Rutas catabólicas de la alanina, glicina, serina, cisteína, triptófano y treonina. En la Fig. 18-21 se muestra el destino del grupo indol del triptófano. En la Fig. 18-20 se muestran detalles de la mayor parte de las reacciones en las que intervienen serina y glicina. La ruta de degradación de la treonina que se muestra aquí sólo explica una tercera parte del catabolismo de la treonina (para la ruta alternativa, véase la Fig. 18-27). Varias rutas de degradación de la cisteína conducen a piruvato. El azufre de la cisteína tiene varios destinos alternativos, uno de los cuales se muestra en la Figura 22-17. Los átomos de carbono de ésta y otras figuras posteriores están codificados en color de forma que pueda seguirse su destino.



serina mediante la adición enzimática de un grupo hidroximetilo (Figs. 18-19 y 18-20b). Esta reacción, catalizada por la **serina hidroximetil transferasa,** requiere los coenzimas tetrahidrofolato y piridoxal fosfato. La serina se convierte en piruvato según se ha descrito anteriormente. En la segunda ruta, predominante en animales, la glicina se rompe de forma oxidativa en CO_2, NH_4^+ y un grupo metileno (—CH_2—) (Figs. 18-19, 18-20c). Esta reacción fácilmente reversible, catalizada por el **enzima de rotura de la glicina** (también llamado glicina sintasa), también requiere tetrahidrofolato, que acepta el grupo metileno. En esta ruta de rotura oxidativa los dos átomos de carbono de la glicina no entran en el ciclo del ácido cítrico. Un carbono se pierde en forma de CO_2 y el otro se convierte en el grupo metileno del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (Fig. 18-17), dador de un grupo monocarbonado en ciertas rutas biosintéticas.

Esta segunda ruta de degradación de la glicina parece ser crítica en los mamíferos. Los humanos con defectos graves en la actividad del enzima de rotura de la glicina sufren una enfermedad denominada hiperglicinemia no cetótica. Esta enfermedad se caracteriza por concentraciones elevadas de glicina en el suero que conducen a deficiencias mentales severas y a la muerte en la niñez muy temprana. A niveles elevados, la glicina es un neurotransmisor inhibidor lo que puede explicar los efectos de la enfermedad. Quizá aún más importante, concentraciones elevadas de glicina incrementan los niveles de 2-amino-3-cetobutirato, un intermediario inestable en la degradación de treonina en las mitocondrias (Fig. 18-19). El 2-amino-3-cetobutirato se descarboxila espontáneamente formando el metabolito tóxico aminoacetona, que se metaboliza rápidamente a **metilglioxal**, una molécula muy reactiva que modifica tanto proteínas como DNA


Metilglioxal

El metilglioxal también es un producto secundario de la glucólisis y está implicado en la progresión de la diabetes tipo 2 (Recuadro 7-1).

En el hombre se han identificado muchos defectos genéticos del metabolismo de los aminoácidos (Tabla 18-2). Encontraremos otros a lo largo de este capítulo. ■

En la tercera y última vía de la degradación de la glicina, la molécula aquiral de glicina es sustrato del enzima D-aminoácido oxidasa. La glicina se convierte en glioxilato, un sustrato alternativo de la lactato deshidrogenasa hepática. El glioxilato se oxida a oxalato en una reacción dependiente de NAD^+:

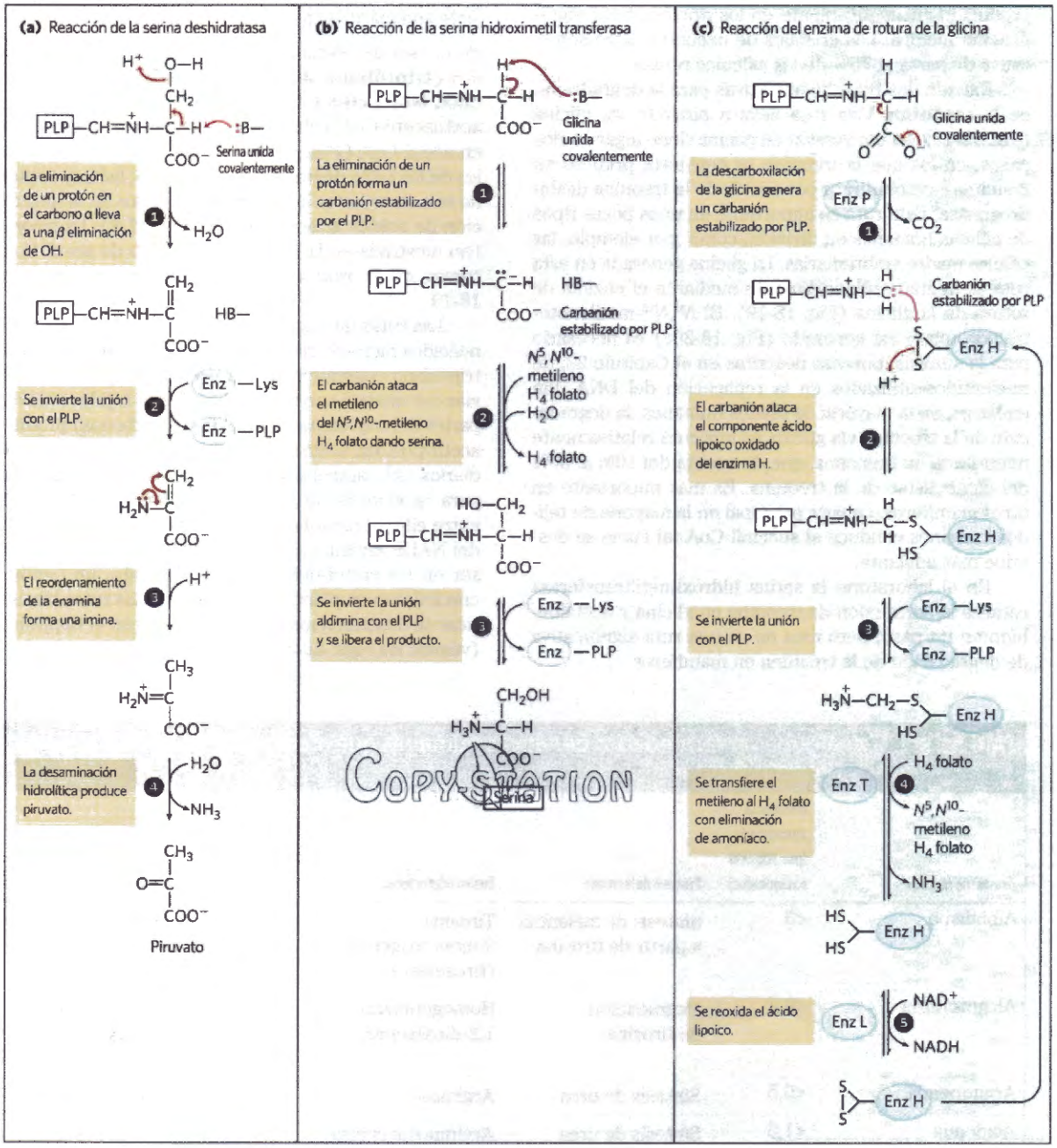
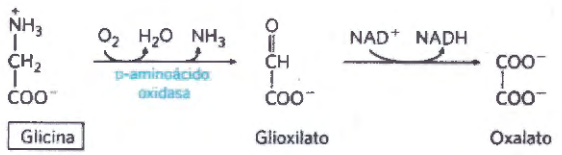


FIGURA DE MECANISMO 18-20 Influencia recíproca de los cofactores piridoxal fosfato y tetrahidrofolato en el metabolismo de la serina y glicina. En el primer paso de cada una de estas reacciones (no mostrado) interviene la formación de una unión imina covalente entre el PLP unido al enzima y el aminoácido sustrato, serina en **(a)** y glicina en **(b)** y **(c)**. **(a)** Una eliminación de agua catalizada por PLP en la reacción de la serina deshidratasa (paso ❶), inicia la ruta hacia el piruvato. **(b)** En la reacción de la serina hidroximetiltransferasa, un carbanión estabilizado por PLP (producto del paso ❶) es un intermedio clave en la transferencia reversible del grupo metileno (en forma de $-CH_2-OH$) desde el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato para formar serina. **(c)** El enzima de rotura de la glicina es un complejo multienzimático que contiene los componentes P, H, T y L. La reacción global, que es reversible, convierte la glicina en CO_2 y NH_4^+ mientras que el segundo carbono de la glicina es captado por el tetrahidrofolato en forma de N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato. El piridoxal fosfato activa el carbono α de los aminoácidos en pasos críticos en todas estas reacciones mientras que el tetrahidrofolato es portador de unidades monocarbonadas en dos de ellas (véanse las Figs. 18-6, 18-17).



Se cree que la función de la D-aminoácido oxidasa, presente a concentraciones elevadas en el riñón, es la destoxificación de D-aminoácidos ingeridos procedentes de las paredes celulares bacterianas y de alimentos cocinados (el calor elevado produce la racemización espontánea de los L-aminoácidos de las proteínas). El oxalato, ya sea obtenido de los alimentos o

producido enzimáticamente en los riñones, tiene significación médica. Los cristales de oxalato cálcico son la causa de hasta el 75% de los cálculos renales. ■

Existen dos rutas significativas para la degradación de la **treonina.** Una ruta lleva a piruvato vía glicina (Fig. 18-19). La conversión en glicina tiene lugar en dos pasos, en los que la treonina se convierte primero en 2-amino-3-cetobutirato por acción de la treonina deshidrogenasa. Esta ruta es importante en unos pocos tipos de células humanas en división, como, por ejemplo, las células madre embrionarias. La glicina generada en esta ruta se degrada principalmente mediante el enzima de rotura de la glicina (Fig. 18-19). El N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato así generado (Fig. 18-20c) es necesario para la síntesis, por vías descritas en el Capítulo 22, de nucleótidos utilizados en la replicación del DNA. Sin embargo, en la mayoría de tejidos humanos, la degradación de la treonina vía glicina es una ruta relativamente minoritaria en humanos, que da cuenta del 10% al 30% del catabolismo de la treonina. Es más importante en otros mamíferos. La ruta principal en la mayoría de tejidos humanos conduce al succinil-CoA tal como se describe más adelante.

En el laboratorio la serina hidroximetiltransferasa cataliza la conversión de treonina en glicina y acetaldehído en un paso, pero ésta no es una ruta significativa de degradación de la treonina en mamíferos.

Siete aminoácidos se degradan a acetil-CoA

Porciones del esqueleto carbonado de siete aminoácidos **(triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina** y **treonina)** producen acetil-CoA y/o acetoacetil-CoA; este último se convierte seguidamente en acetil-CoA **(Fig. 18-21)**. Algunos de los pasos finales de las rutas degradativas de leucina, lisina y triptófano son semejantes a determinados pasos en la degradación de ácidos grasos (véase la Fig. 17-9). La treonina (no mostrada en la Fig. 18-21) da algo de acetil-CoA a través de la ruta minoritaria ilustrada en la Figura 18-19.

Las rutas de degradación de dos de estos siete aminoácidos merecen mención especial. La degradación del triptófano constituye la ruta más compleja de todas las vías del catabolismo de aminoácidos en tejidos animales; partes del triptófano (cuatro de sus carbonos) producen acetil-CoA vía acetoacetil-CoA. Algunos de los intermediarios del catabolismo del triptófano son precursores para la síntesis de otras biomoléculas **(Fig. 18-22)**, entre ellas el nicotinato, que es un precursor del NAD y del NADP en animales; la serotonina, un neurotransmisor en los vertebrados y el indolacetato, un factor de crecimiento en plantas. Algunas de estas rutas biosintéticas se describen más detalladamente en el Capítulo 22 (véanse las Figs. 22-30, 22-31).

TABLA 18-2 Algunas enfermedades genéticas humanas que afectan al catabolismo de aminoácidos

COPYSTATION

Trastorno médico	Incidencia aproximada (por 100.000 nacimientos)	Proceso defectuoso	Enzima defectuoso	Síntomas y efectos
Albinismo	<3	Síntesis de melanina a partir de tirosina	Tirosina 3-monooxigenasa (tirosinasa)	Falta de pigmentación: cabello blanco, piel rosada
Alcaptonuria	<0,4	Degradación de tirosina	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	Pigmento oscuro en la orina; desarrollo posterior de artritis
Argininemia	<0,5	Síntesis de urea	Arginasa	Retraso mental
Acidemia argininosuccínica	<1,5	Síntesis de urea	Argininosuccinasa	Vómito, convulsiones
Deficiencia de carbamil fosfato sintetasa I	<0,5	Síntesis de urea	Carbamil fosfato sintetasa I	Letargia; convulsiones; muerte temprana
Homocistinuria	<0,5	Degradación de metionina	Cistationina β-sintasa	Desarrollo óseo incorrecto; retraso mental
Enfermedad del jarabe de arce en la orina (cetoaciduria de cadena ramificada)	<0,4	Degradación de isoleucina, leucina y valina	Complejo de α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa	Vómitos; convulsiones; retraso mental; muerte temprana
Acidemia metilmalónica	<0,5	Conversión de propionil-CoA en succinil-CoA	Metilmalonil-CoA mutasa	Vómitos; convulsiones; retraso mental; muerte temprana
Fenilcetonuria	<8	Conversión de fenilalanina en tirosina	Fenilalanina hidroxilasa	Vómito neonatal; retraso mental

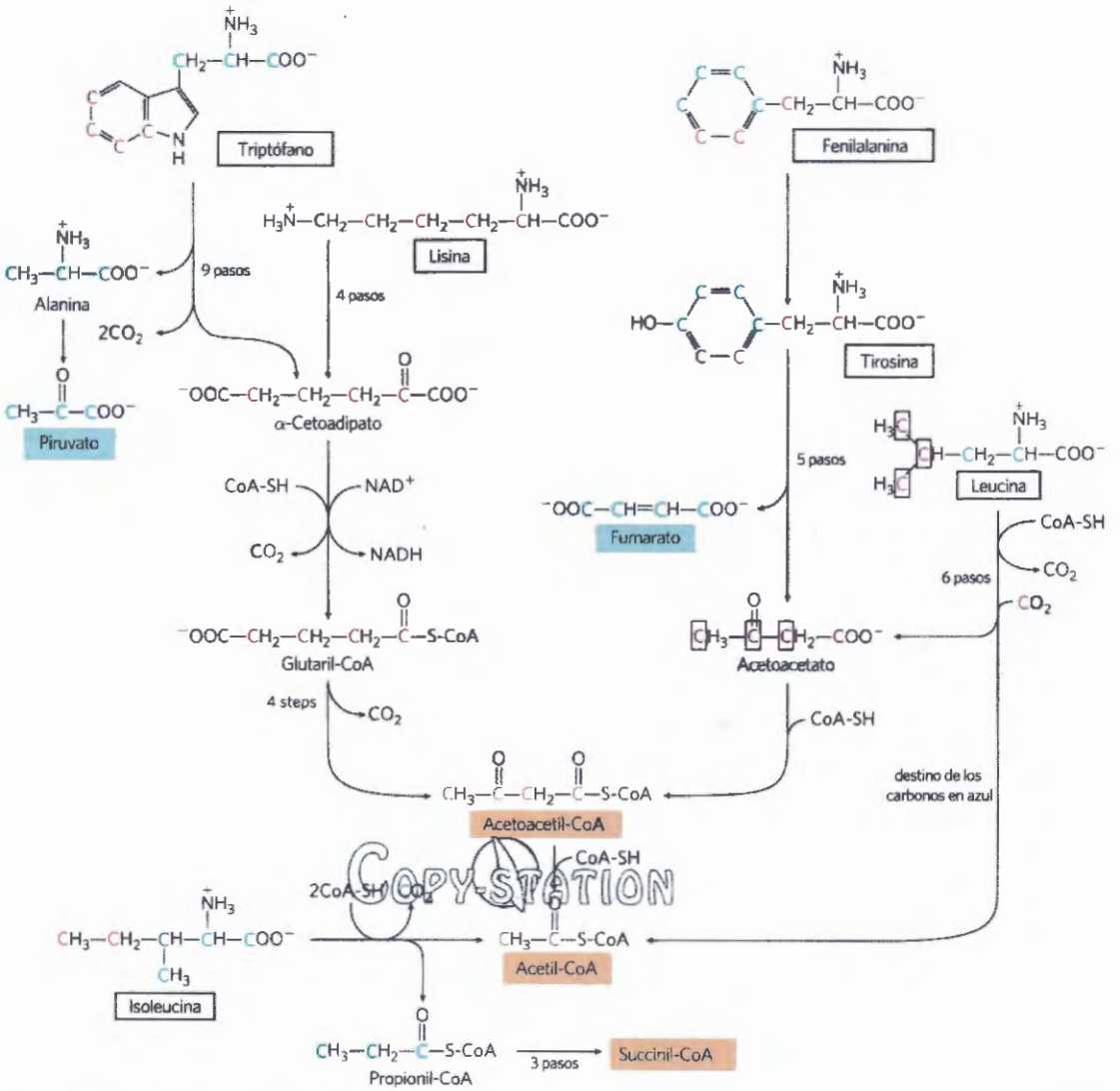


FIGURA 18-21 Rutas catabólicas de triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Estos aminoácidos ceden algunos de sus átomos de carbono (en rojo) al acetil-CoA. El triptófano, fenilalanina, tirosina e isoleucina también aportan carbonos (en azul) al piruvato o intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La ruta de la fenilalanina se describe con mayor detalle en la Fig. 18-23. En este esquema no se muestra el destino de los átomos de nitrógeno; en la mayoría de los casos se transfieren al α-cetoglutarato formando glutamato.

La degradación de la fenilalanina es digna de mención debido a que defectos genéticos en los enzimas de esta ruta conducen a diversas enfermedades hereditarias humanas **(Fig. 18-23)**, tal como se discute más adelante. La fenilalanina y su producto de oxidación tirosina (ambas de nueve carbonos) se degradan dando dos fragmentos que pueden entrar, tanto el uno como el otro, en el ciclo del ácido cítrico: cuatro de los nueve átomos de carbono producen acetoacetato libre, que se convierte en acetoacetil-CoA y por tanto en acetil-CoA, y un segundo fragmento de cuatro carbonos se recupera en forma de fumarato. De este modo, ocho de los nueve átomos de carbono de estos dos aminoácidos entran en el ciclo del ácido cítrico; el carbono restante se pierde en forma de CO_2. La fenilalanina, después de su hidroxilación a tirosina, es también el precursor de la dopamina, un neurotransmisor, y de la noradrenalina y adrenalina, hormonas secretadas por la médula adrenal (véase la Fig. 22-31). La melanina, el pigmento negro de la piel y del pelo, procede también de la tirosina.

En algunas personas el catabolismo de la fenilalanina es genéticamente defectuoso

Dado que muchos aminoácidos son neurotransmisores, o precursores o antagonistas de neurotransmisores, no es sorprendente que defectos genéticos del metabolismo de los aminoácidos puedan producir un desarrollo neuronal defectuoso y retraso mental. En la mayoría de tales enfermedades se acumulan intermediarios específicos. Por ejemplo, un defecto genético de la **fenilalanina hidroxilasa**, el primer enzima de la ruta catabólica de la fenilalanina (Fig. 18-23), es responsable de la enfermedad **fenilcetonuria (PKU)**, la causa más frecuente de la presencia de niveles elevados de fenilalanina (hiperfenilalaninemia).

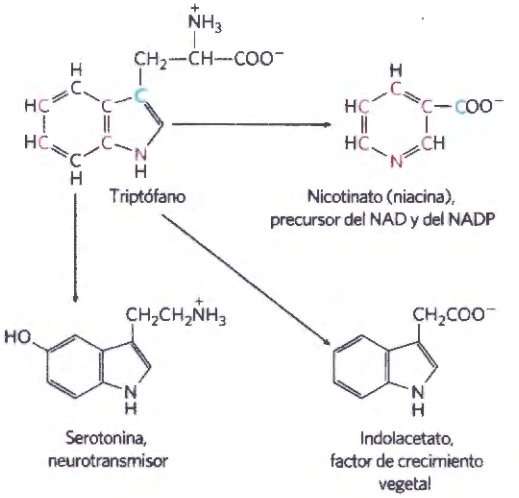


FIGURA 18-22 El triptófano como precursor. Los anillos aromáticos del triptófano dan lugar al nicotinato (niacina), indolacetato y serotonina. Se utilizan átomos coloreados para seguir el origen de los átomos del anillo en el nicotinato.

La fenilalanina hidroxilasa (denominada también fenilalanina-4-monooxigenasa) pertenece a una clase general de enzimas denominados **oxidasas de función mixta** (véase el Recuadro 21-1), que catalizan la hidroxilación simultánea de un sustrato por un átomo de oxígeno del O_2 y la reducción del otro átomo de oxígeno a H_2O. La fenilalanina hidroxilasa requiere el cofactor tetrahidrobiopterina, que transporta electrones desde el NADPH al O_2 oxidándose a dihidrobiopterina en el proceso **(Fig. 18-24)**. Seguidamente es reducida por el enzima **dihidrobiopterina reductasa**, en una reacción que requiere NADPH.

En individuos con PKU, entra en juego una ruta secundaria del metabolismo de la fenilalanina, que normalmente se utiliza muy poco, en la que la fenilalanina se transamina con el piruvato dando **fenilpiruvato (Fig. 18-25)**. La fenilalanina y el fenilpiruvato se acumulan en la sangre y tejidos y se excretan en la orina: de ahí el nombre de la enfermedad, "fenilcetonuria". Gran parte del fenilpiruvato en vez de excretarse como tal, o se descarboxila produciendo fenilacetato o se reduce formando fenil-lactato. El fenilacetato confiere un olor característico a la orina, que ha sido utilizado tradicionalmente por las enfermeras para detectar la PKU en los lactantes. La acumulación de fenilalanina o sus metabolitos en las primeras etapas de la vida perjudica el desarrollo normal del cerebro dando lugar a retraso mental grave. La causa puede ser que el exceso de fenilalanina compita con otros aminoácidos en el transporte a través de la barrera hemato-encefálica, dando lugar a un déficit de metabolitos imprescindibles.

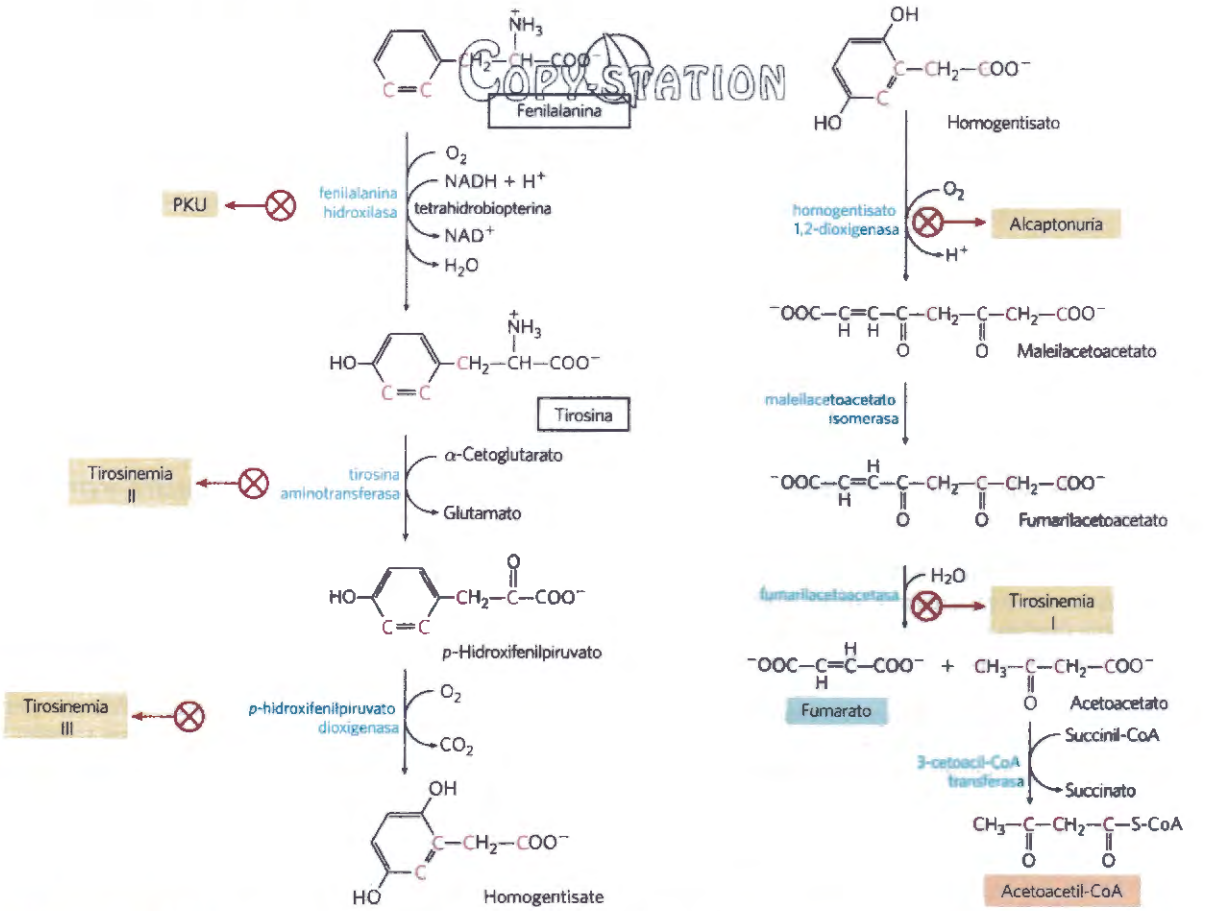


FIGURA 18-23 Rutas catabólicas de la fenilalanina y tirosina. Estos aminoácidos se convierten normalmente en acetoacetil-CoA y fumarato en los humanos. Se sabe que defectos genéticos en muchos de estos enzimas producen enfermedades congénitas humanas (sombreadas en amarillo)

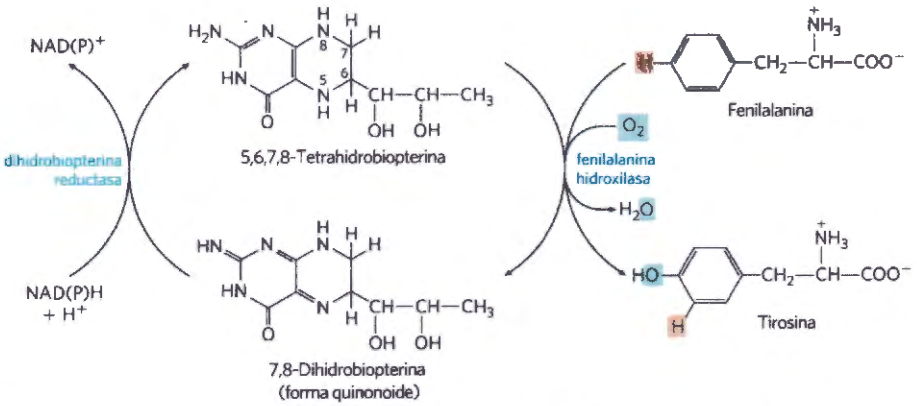


FIGURA 18-24 Función de la tetrahidrobiopterina en la reacción de la fenilalanina hidroxilasa. El átomo de H sombreado en rosa, se transfiere directamente desde el C-4 al C-3 en la reacción. Esta característica, descubierta en los National Institutes of Health, se conoce como "desplazamiento NIH".

La fenilcetonuria fue uno de los primeros defectos genéticos humanos que se descubrieron. Cuando se detecta esta enfermedad de forma precoz, se puede prevenir en gran parte el retraso mental mediante un control dietético rígido. La dieta ha de suministrar sólo la fenilalanina y tirosina suficientes para cubrir las necesidades de la síntesis proteica. Se ha de restringir el consumo de alimentos ricos en proteína. Las proteínas naturales, tales como la caseína de la leche, se han de hidrolizar previamente y eliminar la mayor parte de la fenilalanina para proporcionar una dieta adecuada, al menos durante la infancia. Como el edulcorante artificial aspartamo es un dipéptido de aspartato y del éster metílico de la fenilalanina (véase la Fig. 1-25b), los alimentos edulcorados con aspartamo llevan advertencias para las personas con dietas controladas en fenilalanina. Las restricciones de la dieta son difíciles de seguir a la perfección toda la vida por lo que, a menudo, no se eliminan completamente todos los síntomas neurológicos. Se está desarrollando un nuevo tratamiento en el que se toma, por vía oral o inyectado subcutáneamente, el enzima fenilalanina amoníaco liasa para degradar la fenilalanina de las proteínas ingeridas como parte de una dieta menos restrictiva. La fenilalanina amoníaco liasa, procedente de plantas, bacterias y muchas levaduras y hongos, contribuye normalmente a la biosíntesis de compuestos polifenólicos tales ccomo los flavonoides. Degrada la fenilalanina dando el metabolito inocuo ácido *trans*-cinámico y amoníaco; las pequeñas cantidades de amoníaco generadas no son tóxicas.

La fenilcetonuria también puede ser provocada por un defecto en el enzima que cataliza la regeneración de la tetrahidrobiopterina (Fig. 18-24). El tratamiento en este caso es más complejo que restringir la ingestión de fenilalanina y tirosina. La tetrahidrobiopterina es también necesaria para la formación de l-3,4-dihidroxifenilalanina (l-dopa) y 5-hidroxitriptófano, precursores de los neurotransmisores noradrenalina y serotonina, respectivamente. En la fenilcetonuria de este tipo estos precursores deben ser suministrados con la dieta junto con tetrahidrobiopterina.

El rastreo de enfermedades genéticas en los recién nacidos puede ser muy rentable, especialmente en el caso de la PKU. Las pruebas (que ya no se basan en el olor de la orina) son relativamente baratas y la detección y tratamiento temprano de la PKU en los lactantes (ocho a diez casos por cada 100.000 nacimientos) ahorra millones de dólares cada año en gastos sanitarios posteriores. Más importante todavía, el trauma emocional humano que se evita con estas pruebas sencillas es incalculable.

Otro defecto hereditario del catabolismo de la fenilalanina es la **alcaptonuria**, en la que el enzima defectuoso es la **homogentisato dioxigenasa** (Fig. 18-23). Esta enfemedad, menos grave que la PKU, produce pocos efectos nocivos, aunque se excretan grandes cantidades de homogentisato y su oxidación hace que la orina se vuelva negra. Los individuos con alcaptonuria son también propensos a desarrollar una forma de artritis. La alcaptonuria tiene un considerable interés histórico. En

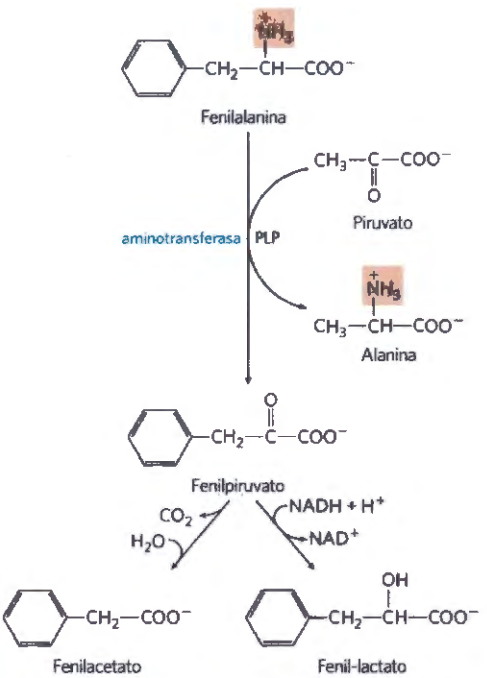
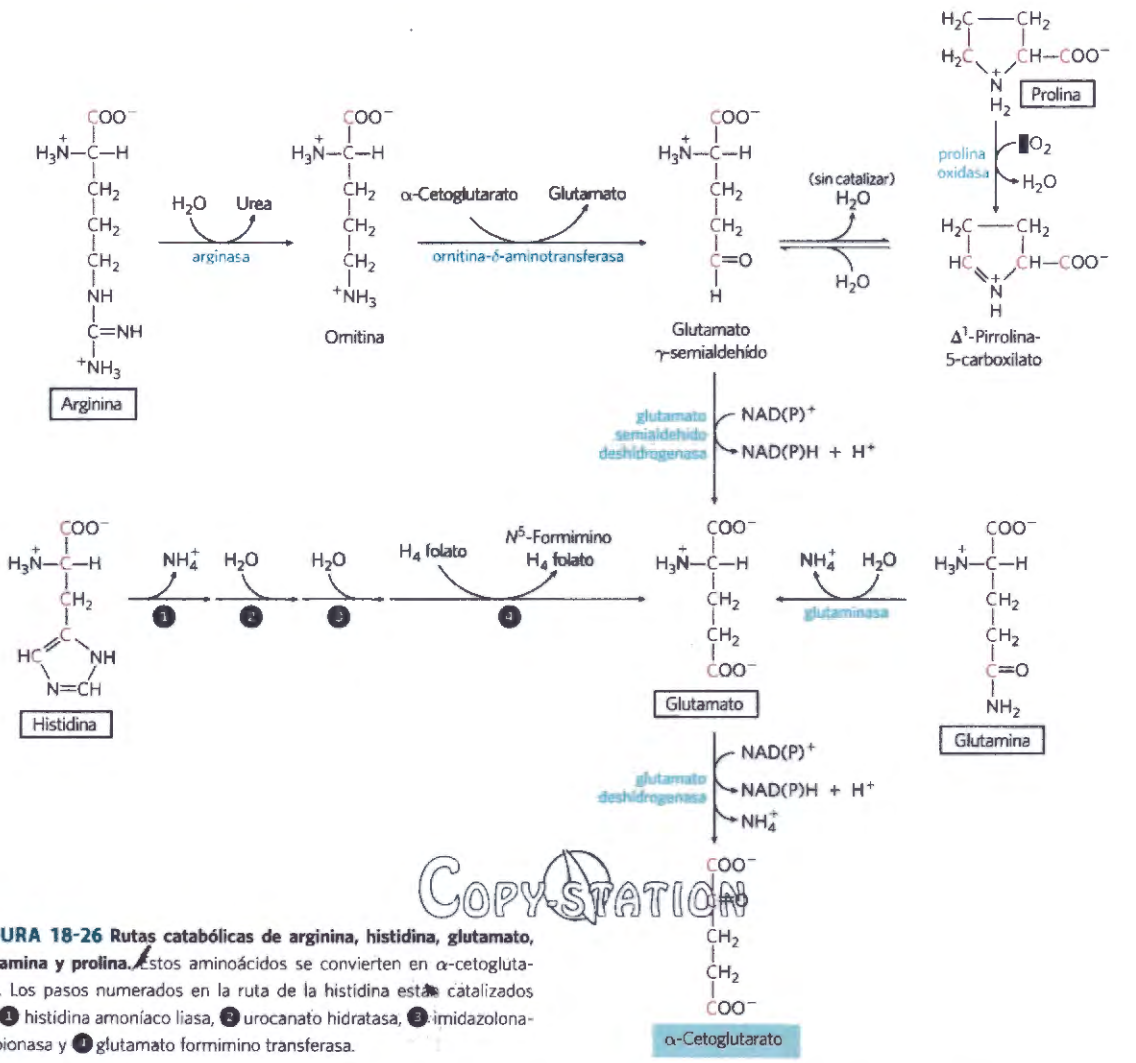


FIGURA 18-25 Rutas alternativas para el catabolismo de la fenilalanina en la fenilcetonuria. En la PKU, el fenilpiruvato se acumula en los tejidos, sangre y orina. El fenilacetato y el fenil-lactato se pueden encontrar también en la orina.



COPY-STATION

FIGURA 18-26 Rutas catabólicas de arginina, histidina, glutamato, glutamina y prolina. Estos aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato. Los pasos numerados en la ruta de la histidina están catalizados por ❶ histidina amoníaco liasa, ❷ urocanato hidratasa, ❸ imidazolonapropionasa y ❹ glutamato formimino transferasa.

los primeros años del siglo XIX, Archibald Garrod descubrió que esta enfermedad es hereditaria, y consiguió establecer que se debía a la ausencia de un único enzima. Garrod fue el primero en establecer una conexión entre un defecto hereditario y un enzima, lo que constituyó un avance importante en la senda que llevó finalmente a nuestro conocimiento actual sobre los genes y las rutas de la información descritas en la Parte III. ■

Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato

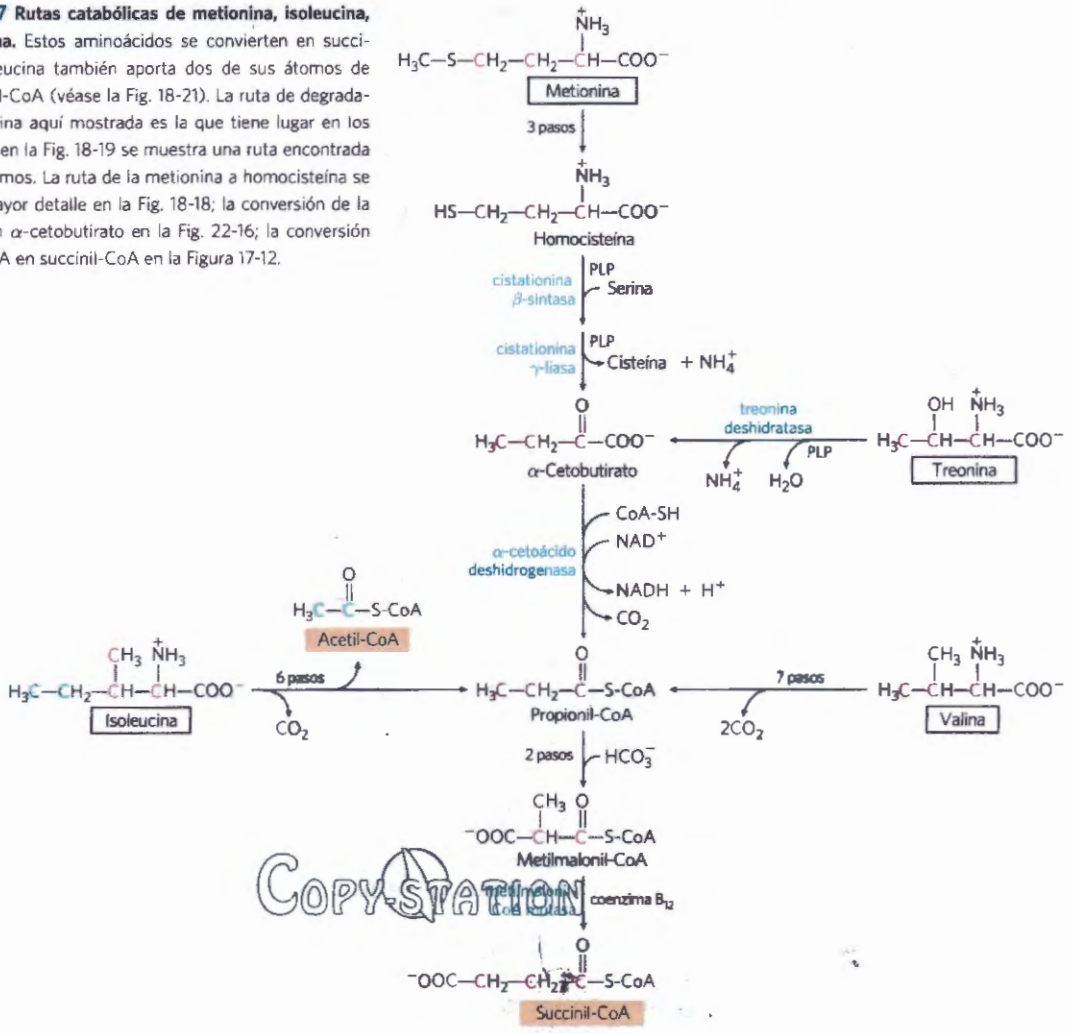
Los esqueletos carbonados de cinco aminoácidos (prolina, glutamato, glutamina, arginina e histidina) entran en el ciclo del ácido cítrico en forma de α-cetoglutarato **(Fig. 18-26)**. La **prolina**, **glutamato** y **glutamina** tienen esqueletos pentacarbonados. La estructura cíclica de la prolina se abre por oxidación del carbono más alejado del grupo carboxílico creando una base de Schiff, que se hidroliza dando un semialdehído lineal, el glutamato γ-semialdehído. Este intermediario vuelve a oxidarse en el mismo carbono produciendo glutamato. La acción de la glutaminasa, o cualquiera de las diversas reacciones enzimáticas en las que la glutamina cede su nitrógeno amídico a algún aceptor, convierte la glutamina en glutamato. La transaminación o desaminación del glutamato produce α-cetoglutarato.

La **arginina** y la **histidina** contienen cinco carbonos adyacentes y un sexto carbono unido a través de un átomo de nitrógeno. La conversión catabólica de estos aminoácidos en glutamato es, por tanto, algo más compleja que la ruta de la prolina o glutamina (Fig. 18-26). La arginina se convierte en el esqueleto pentacarbonado de la ornitina en el ciclo de la urea (véase la Fig. 18-10) y la ornitina se transamina a glutamato γ-semialdehído. La conversión de la histidina en glutamato de cinco carbonos tiene lugar mediante una ruta de varios pasos; el carbono extra se elimina en un paso que utiliza tetrahidrofolato como cofactor.

Cuatro aminoácidos se convierten en succinil-CoA

Los esqueletos carbonados de la metionina, isoleucina, treonina y valina se degradan a través de rutas que producen succinil-CoA **(Fig. 18-27)**, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. La **metionina** cede su grupo metilo a través de la *S*-adenosilmetionina a uno de los diversos aceptores posibles mientras que tres de sus cuatro carbonos restantes se convierten en el propionato del propionil-CoA, un precursor del succinil-CoA. La **isoleucina** experimenta transaminación, seguida de la descarboxilación oxidativa del α-cetoácido resultante. El esqueleto pentacarbonado restante vuelve a oxidarse

FIGURA 18-27 Rutas catabólicas de metionina, isoleucina, treonina y valina. Estos aminoácidos se convierten en succinil-CoA; la isoleucina también aporta dos de sus átomos de carbono al acetil-CoA (véase la Fig. 18-21). La ruta de degradación de la treonina aquí mostrada es la que tiene lugar en los seres humanos; en la Fig. 18-19 se muestra una ruta encontrada en otros organismos. La ruta de la metionina a homocisteína se describe con mayor detalle en la Fig. 18-18; la conversión de la homocisteína en α-cetobutirato en la Fig. 22-16; la conversión del propionil-CoA en succinil-CoA en la Figura 17-12.



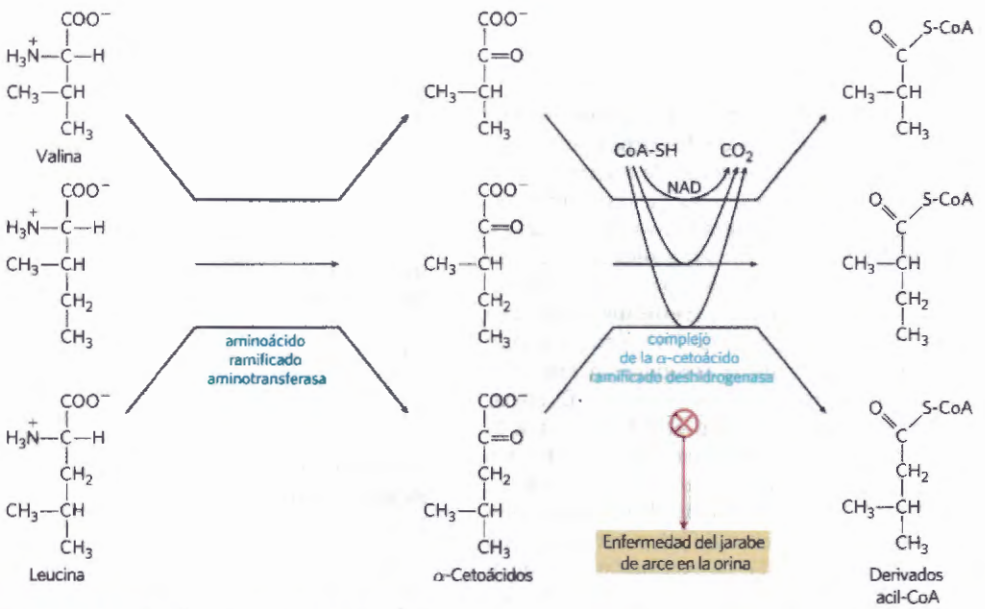


FIGURA 18-28 Rutas catabólicas de los tres aminoácidos ramificados: valina, isoleucina y leucina. Las tres rutas, que tienen lugar en tejidos extrahepáticos, comparten los dos primeros enzimas tal como se muestra aquí. El complejo de la α-cetoácido ramificado deshidrogenasa, es análogo a los complejos de la piruvato y α-cetoglutarato deshidrogenasas y requiere los mismos cinco cofactores (algunos no mostrados en esta figura). Este enzima es defectuoso en personas con la enfermedad del jarabe de arce en la orina.

RECUADRO 18-2 MEDICINA Detectives científicos resuelven un crimen misterioso

La verdad puede ser a veces más extraña que la ficción, o al menos tan extraña como una película filmada expresamente para la televisión. Tomemos, por ejemplo el caso de Patricia Stallings. Declarada culpable del asesinato de su hijo pequeño, fue sentenciada a cadena perpetua, si bien después fue hallada inocente gracias a la investigación detectivesca médica de tres científicos obstinados.

La historia empezó en el verano de 1989 cuando Stallings llevó a su hijo de tres meses, Ryan, a las urgencias del Cardinal Glennon Children's Hospital de St. Louis. El niño padecía dificultad respiratoria, vómitos incontrolables y trastornos gástricos. Según el médico que lo atendió, un toxicólogo, los síntomas del niño indicaban que había sido envenenado con etilenglicol, un ingrediente de los anticongelantes, conclusión aparentemente confirmada por análisis hechos en un laboratorio privado.

Una vez recuperado, el niño fue puesto bajo tutela y la Stallings y su marido, David, podían visitarlo en visitas vigiladas. Pero cuando el niño enfermó, y más tarde murió, después de una visita en la que la Stallings había permanecido brevemente sola con el niño, se la acusó de asesinato en primer grado y se la detuvo sin fianza. En aquellos momentos las pruebas parecían claras puesto que tanto el laboratorio privado como el del hospital habían encontrado grandes cantidades de etilenglicol en la sangre del niño y trazas del mismo en un biberón con la que la Stallings había alimentado al niño durante su visita.

Pero sin saberlo la Stallings había llevado a cabo un experimento brillante. Mientras estaba en prisión, supo que estaba embarazada; posteriormente dio a luz a otro hijo, David Stallings Jr, en febrero de 1990. Inmediatamente ingresó en un orfanato pero a las dos semanas empezó a tener síntomas similares a los de Ryan. A David se le diagnosticó finalmente una enfermedad metabólica rara denominada acidemia metilmalónica (MMA). La MMA, una enfermedad genética recesiva del metabolismo de los aminoácidos, afecta a 1 de cada 48.000 nacidos y presenta síntomas casi idénticos a los producidos por el envenenamiento con etilenglicol.

La Stallings no podía de ningún modo haber envenenado a su segundo hijo, pero el fiscal del estado de Missouri no quedó impresionado por los nuevos acontecimientos y prosiguió de todos modos con el proceso. El tribunal no permitió que el diagnóstico de MMA del segundo hijo fuese aceptado como prueba, y en enero de 1991 Patricia Stallings fue hallada culpable de agresión con arma mortal y condenada a cadena perpetua.

Sin embargo, afortunadamente para la Stallings, William Sly, director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de St. Louis, y James Shoemaker, director de un laboratorio de rastreo metabólico de la universidad, se interesaron en su caso cuando se enteraron del mismo en un programa de televisión. Shoemaker llevó a cabo su propio análisis de la sangre de Ryan y no detectó etilenglicol. Él y Sly se pusieron en contacto con Piero Rinaldo, experto en enfermedades metabólicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, cuyo laboratorio estaba equipado para diagnosticar la MMA a partir de muestras de sangre.

Cuando Rinaldo analizó el suero sanguíneo de Ryan encontró una alta concentración de ácido metilmalónico, que es un producto de degradación de los aminoácidos de cadena ramificada isoleucina y valina, que se acumulan en los pacientes de MMA porque carecen del enzima que debería transformarlo en el

Copy Station

dando acetil-CoA y propionil-CoA. La **valina** experimenta transaminación seguida de descarboxilación, y a continuación una serie de reacciones de oxidación convierte los cuatro carbonos restantes en propionil-CoA. Algunas partes de las rutas degradativas de la valina y de la isoleucina están estrechamente relacionadas con pasos de la degradación de ácidos grasos (véase la Fig. 17-9). En los tejidos humanos, la **treonina** también se convierte en dos pasos en propionil-CoA. Ésta es la ruta principal de degradación de la treonina en humanos (véase la Fig. 18-19 para la ruta alternativa). El mecanismo del primer paso es análogo al catalizado por la serina deshidratasa por lo que la serina y la treonina deshidratasas podrían, de hecho, ser el mismo enzima.

El propionil-CoA formado a partir de estos tres aminoácidos se convierte en succinil-CoA a través de una ruta descrita en el Capítulo 17: carboxilación a metilmalonil-CoA, epimerización del metilmalonil-CoA, y conversión en succinil-CoA por la metilmalonil-CoA mutasa, dependiente del coenzima B_{12} (véase la Fig. 17-12). En la rara enfermedad genética denominada acidemia metilmalónica, la metilmalonil-CoA mutasa está ausente, lo que provoca consecuencias metabólicas graves (Tabla 18-2; Recuadro 18-2).

Los aminoácidos ramificados no se degradan en el hígado

Aunque gran parte del catabolismo de los aminoácidos transcurre en el hígado, los tres aminoácidos con cadenas laterales ramificadas (leucina, isoleucina y valina) se oxidan como combustibles principalmente en los tejidos muscular, adiposo, renal y cerebral. Estos tejidos extrahepáticos contienen una aminotransferasa, ausente del hígado, que actúa sobre los tres aminoácidos ramificados produciendo los α-cetoácidos correspondientes **(Fig. 18-28)**. El **complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa**, cataliza a continuación la descarboxilación oxidativa de los tres α-cetoácidos, liberando en cada caso el grupo carboxilo en forma de CO_2 y produciendo el derivado acil-CoA correspondiente. Esta reacción es formalmente análoga a otras dos descarboxilaciones oxidativas que se encontraron en el Capítulo 16: la oxidación del piruvato a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (véase la Fig. 16-6) y la oxida-

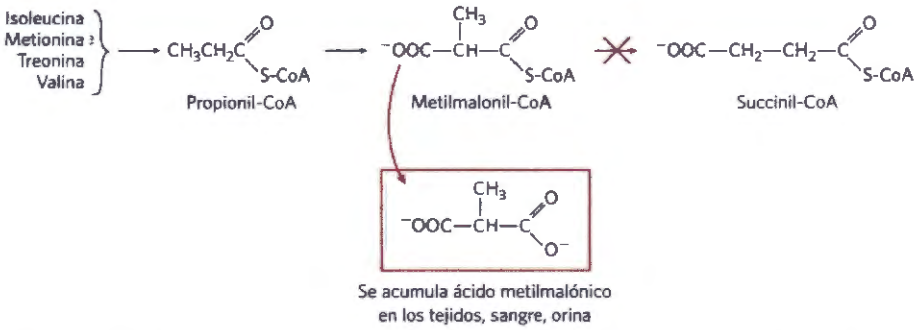


FIGURA 1 Los niños con una mutación (X roja) que inactiva el enzima metilmalonil-CoA mutasa no pueden degradar normalmente isoleucina, metionina, treonina y valina. En su lugar se produce una acumulación letal de ácido metilmalónico con síntomas similares al envenenamiento por etilén glicol.

siguiente producto de su ruta metabólica (Fig. 1). Especialmente revelador, según su relato, era que la sangre y la orina del niño contenían grandes cantidades de cetonas, lo que constituye otra consecuencia metabólica de la enfermedad. Al igual que Shoemaker, no encontró etilenglicol en una muestra de los fluidos corporales del niño. No se pudo analizar el biberón, ya que había desaparecido misteriosamente. Los análisis de Rinaldo le convencieron de que Ryan había muerto de MMA, pero ¿cómo explicar los resultados de los dos laboratorios que indicaban que el niño tenía etilenglicol en su sangre? ¿Podían estar los dos equivocados?

Cuando Rinaldo obtuvo los informes de los laboratorios, lo que vio, dice, fue "espantoso". Un laboratorio decía que la sangre de Ryan Stallings contenía etilenglicol, aunque el análisis de la muestra de sangre no se ajustaba al perfil del propio laboratorio para una muestra conocida que contenía etilenglicol. "Esto no era solamente un asunto de interpretación cuestionable. La calidad de sus análisis era inaceptable" dice Rinaldo. ¿Y el segundo laboratorio? Según Rinaldo aquel laboratorio detectó un componente anormal en la sangre de Ryan y simplemente "supusieron que era etilenglicol". Las muestras del biberón no habían dado nada anormal, dice Rinaldo, y sin embargo el laboratorio también afirmó que tenían pruebas de la presencia de etilenglicol en la misma.

Rinaldo presentó sus hallazgos al fiscal del caso, George McElroy, quien al día siguiente convocó una conferencia de prensa. "Ya no creo en los datos de los laboratorios" dijo a los periodistas. Habiendo concluido que Ryan Stallings había muerto efectivamente de MMA, retiró todos los cargos contra Patricia Stallings el 20 de setiembre de 1991.

COPY-STATION

Por Michelle Hoffman (1991). *Science* **253**, 931. Copyright 1991 by the American Association for the Advancement of Science.

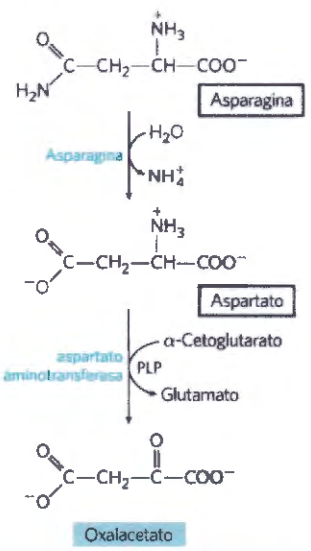


FIGURA 18-29 Ruta catabólica para asparagina y aspartato. Ambos aminoácidos se convierten en oxalacetato.

ción del α-cetoglutarato a succinil-CoA por el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa. De hecho, los tres complejos enzimáticos tienen una estructura semejante y comparten esencialmente el mismo mecanismo de reacción. Participan cinco cofactores (tiamina pirofosfato, FAD, NAD, lipoato y coenzima A), y las tres proteínas de cada complejo catalizan reacciones homólogas. Es éste un caso claro en el que la maquinaria enzimática que evolucionó para catalizar una reacción fue "tomada en préstamo" por duplicación génica y posterior evolución para catalizar reacciones similares en otras rutas.

Experimentos en ratas han demostrado que el complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa está regulado por modificación covalente en respuesta al contenido en aminoácidos de cadena ramificada de la dieta. Cuando no hay exceso, o muy poco, de ingestión en la dieta de aminoácidos de cadena ramificada, el complejo enzimático es fosforilado, y de esta forma inactivado, por una proteína quinasa. La adición de un exceso de aminoácidos de cadena ramificada a la dieta provoca la desfosforilación y activación consiguiente del enzima. Recuérdese que el complejo de la

piruvato deshidrogenasa está sujeto a una regulación similar por fosforilación y desfosforilación.

Existe una enfermedad genética relativamente rara en la que estos tres α-cetoácidos ramificados (así como sus aminoácidos precursores, en especial la leucina) se acumulan en la sangre y se "vierten" en la orina. Esta enfermedad, denominada **enfermedad del jarabe de arce en la orina**, debido al olor característico que los α-cetoácidos le confieren a la orina, es el resultado de un complejo de la α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa defectuoso. Si la enfermedad no se trata da lugar a un desarrollo anormal del cerebro, retraso mental y muerte en la infancia temprana. El tratamiento consiste en un control rígido de la dieta, para limitar la ingestión de valina, isoleucina y leucina al mínimo necesario para permitir el crecimiento normal. ■

La asparagina y el aspartato se degradan a oxalacetato

Los esqueletos carbonados de la **asparagina** y del **aspartato** entran en último término en el ciclo del ácido cítrico en forma de malato en los mamíferos y de oxalacetato en las bacterias. El enzima **asparaginasa** cataliza la hidrólisis de la asparagina para dar aspartato, el cual experimenta transaminación con el α-cetoglutarato, dando glutamato y oxalacetato **(Fig. 18-29)**. El oxalacetato se convierte en malato en el citosol y, a continuación, es transportado a la matriz mitocondrial a través del transportador de malato- α-cetoglutarato. En bacterias el oxalacetato producido en la reacción de transaminación puede utilizarse directamente en el ciclo del ácido cítrico.

Ya hemos visto de qué modo se degradan los 20 aminoácidos estándar, después de perder sus átomos de nitrógeno, mediante deshidrogenación, descarboxilación y otras reacciones, que ceden parte de sus esqueletos carbonados en la forma de seis metabolitos centrales que puedan entrar en el ciclo del ácido cítrico. Las partes degradadas a acetil-CoA se oxidan completamente a dióxido de carbono y agua, con generación de ATP por fosforilación oxidativa.

De la misma manera que en el caso de glúcidos y lípidos, la degradación de los aminoácidos produce en último término equivalentes de reducción (NADH y $FADH_2$) a través de la acción del ciclo del ácido cítrico. El estudio de los procesos catabólicos concluye en el próximo capítulo con una discusión de la respiración, en la que estos equivalentes de reducción alimentan los procesos oxidativos y generadores de energía finales de los organismos aeróbicos.

RESUMEN 18.3 Rutas de degradación de los aminoácidos

■ Después de la eliminación de sus grupos amino, los esqueletos carbonados de los aminoácidos se oxidan a compuestos que pueden entrar en el ciclo del ácido cítrico para ser oxidados a CO_2 y H_2O. Las reacciones de estas rutas requieren diversos cofactores, entre los que se incluyen el tetrahidrofolato y la *S*-adenosilmetionina en reacciones de transferencia de un carbono y la tetrahidrobiopterina en la oxidación de la fenilalanina por la fenilalanina hidroxilasa.

■ Según la naturaleza de su producto final de degradación, algunos aminoácidos se pueden convertir en cuerpos cetónicos, algunos en glucosa y otros en ambos. Así, la degradación de aminoácidos está integrada en el metabolismo intermediario y puede ser crítica para la supervivencia en condiciones en las que los aminoácidos constituyen una fuente significativa de energía metabólica.

■ Los esqueletos carbonados de los aminoácidos entran en el ciclo del ácido cítrico a través de cinco intermediarios: acetil-CoA, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato y oxalacetato. Algunos también se degradan a piruvato, que se puede convertir bien en acetil-CoA, bien en oxalacetato.

■ Los aminoácidos que producen piruvato son alanina, cisteína, glicina, serina, treonina y triptófano. Leucina, lisina, fenilalanina, y triptófano dan acetil-CoA vía acetoacetil-CoA. Isoleucina, leucina, treonina y triptófano también forman acetil-CoA directamente.

■ Arginina, glutamato, glutamina, histidina y prolina, producen α-cetoglutarato; isoleucina, metionina, treonina y valina producen succinil-CoA; cuatro átomos de carbono de la fenilalanina y tirosina dan lugar a fumarato; asparagina y aspartato producen oxalacetato.

■ Los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina), a diferencia del resto de aminoácidos, se degradan solamente en tejidos extrahepáticos.

■ Diversas enfermedades humanas graves pueden relacionarse con defectos genéticos de enzimas del catabolismo de los aminoácidos.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

aminotransferasa 677
transaminasas 677
transaminación 677
piridoxal fosfato (PLP) 677
desaminación oxidativa 678
l-glutamato deshidrogenada 678
glutamina sintetasa 679
glutaminasa 679
ciclo de la glucosa-alanina 680
amonotélico 682
ureotélico 682
uricotélico 682
ciclo de la urea 682
urea 684
creatina quinasa 686
aminoácidos esenciales 686
cetogénico 688
glucogénico 688
tetrahidrofolato 689
***S*-adenosilmetionina (adoMet)** 689
tetrahidrobiopterina 691
fenilcetonuria (PKU) 695
oxidasas de función mixta 696
alcaptonuria 697
enfermedad del jarabe de arce en la orina 702

Problemas

1. Productos de la transaminación de aminoácidos Dibuje la estructura y dé el nombre del α-cetoácido que se forma cuando los siguientes aminoácidos experimentan transaminación con α-cetoglutarato: (a) aspartato, (b) glutamato (c) alanina, (d) fenilalanina.

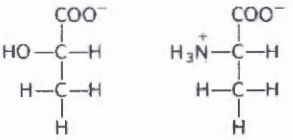
2. Medida de la actividad alanina aminotransferasa La actividad (velocidad de reacción) de la alanina aminotransferasa se mide normalmente incluyendo un exceso de lactato deshidrogenasa pura y NADH en el sistema de reacción. La velocidad de desaparición de la alanina es igual a la velocidad de desaparición del NADH medida espectrofotométricamente. Explique de qué modo funciona este ensayo.

COPY-STATION

3. Alanina y glutamina en la sangre El plasma sanguíneo humano normal contiene todos los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas corporales, pero no en las mismas concentraciones. La alanina y la glutamina se encuentran en concentraciones mucho mayores que el resto de aminoácidos. Sugiera por qué.

4. Distribución del nitrógeno amínico Si su dieta es rica en alanina pero deficiente en aspartato, ¿se notarán signos de deficiencia de aspartato? Explíquelo.

5. Lactato frente a alanina como combustible metabólico: el coste de la eliminación del nitrógeno Los tres carbonos del lactato y de la alanina tienen estados de oxidación idénticos por lo que los animales pueden utilizar cualquiera de estas dos fuentes de carbono como combustible metabólico. Compare el rendimiento neto de ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa (a CO_2 y H_2O) del lactato frente a la alanina, cuando se incluye el coste de la excreción de nitrógeno en forma de urea



Lactato Alanina

6. Toxicidad del amoníaco resultante de una dieta deficiente en arginina En un estudio realizado hace algunos años, se hizo ayunar a gatos durante la noche dándoles después una sola comida completa en todos los aminoácidos excepto la arginina. A las 2 horas, los niveles de amoníaco sanguíneo aumentaron desde un nivel normal de 18 $\mu g/L$ a 140 $\mu g/L$ y los gatos mostraron los síntomas clínicos de la toxicidad del amoníaco. Un grupo control alimentado con una dieta completa en aminoácidos o una dieta de aminoácidos en la que se había sustituido la arginina por ornitina no mostró síntomas clínicos extraños.

(a) ¿Cuál era el objetivo del ayuno en el experimento?

(b) ¿Qué es lo que hizo aumentar los niveles de amoníaco en el grupo experimental? ¿Por qué la ausencia de arginina condujo a toxicidad por amoníaco? ¿Es la arginina un aminoácido esencial en los gatos? ¿Por qué sí o por qué no?

(c) ¿Por qué se puede sustituir la arginina por ornitina?

7. Oxidación del glutamato Escriba una serie de ecuaciones igualadas, y la ecuación de la reacción global neta, que describan la oxidación de 2 moles de glutamato a 2 moles de α-cetoglutarato y 1 mol de urea.

8. Transaminación y ciclo de la urea La aspartato aminotransferasa tiene la actividad más elevada de todas las aminotransferasas hepáticas de mamífero. ¿Por qué?

9. El caso contra la dieta de proteína líquida Una dieta para la reducción de peso muy promocionada hace algunos años requería la ingestión diaria de "proteína líquida" (sopa de gelatina hidrolizada), agua, y un surtido de vitaminas. Se había de evitar cualquier otra comida o bebida. Con esta dieta las personas perdían típicamente entre 5 y 7 kg en la primera semana.

(a) Los oponentes argumentaban que la pérdida de peso se debía casi exclusivamente a la pérdida de agua por lo que se recuperaría casi inmediatamente cuando se volviese a la dieta normal. ¿Cuál es la base bioquímica de este argumento?

(b) Varias personas que seguían esta dieta murieron. ¿Cuáles son algunos de los peligros inherentes en la dieta y de qué modo podían conducir a la muerte?

10. Aminoácidos cetogénicos ¿Qué aminoácidos son exclusivamente cetogénicos?

11. Un defecto genético en el metabolismo de los aminoácidos: una historia clínica . Un niño de dos años ingresó en el hospital. Su madre indicó que vomitaba frecuentemente, especialmente después de las comidas. El peso del niño y el desarrollo físico estaban por debajo de lo normal. Su cabello, aunque oscuro, tenía manchas blancas. Una muestra de orina tratada con cloruro férrico ($FeCl_3$) dio un color verde característico de la presencia de fenilpiruvato. El análisis cuantitativo de muestras de orina dio los resultados que se muestran en la siguiente tabla

	Concentración (mM)	
Sustancia	**Orina del paciente**	**Orina normal**
Fenilalanina	7,0	0,01
Fenilpiruvato	4,8	0
Fenil-lactato	10,3	0

(a) Sugiera qué enzima puede ser deficiente en este niño. Proponga un tratamiento.

(b) ¿Por qué aparece la fenilalanina en la orina en grandes cantidades?

(c) ¿Cuál es el origen del fenilpiruvato y del fenil-lactato? ¿Por qué esta ruta (normalmente no funcional) entra en juego cuando aumenta la concentración de fenilalanina?

(d) ¿Por qué el pelo del niño tiene manchas blancas?

12. Papel de la cobalamina en el catabolismo de los aminoácidos La anemia perniciosa está producida por una absorción defectuosa de vitamina B_{12}. ¿Cuál es el efecto de esta anomalía sobre el catabolismo de los aminoácidos? ¿Están afectados todos los aminoácidos de igual manera? (Sugerencia: Véase el Recuadro 17-2).

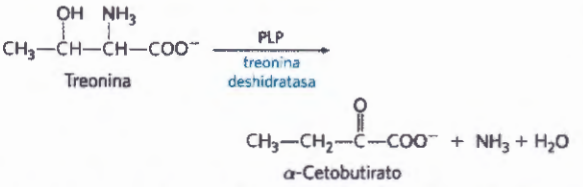
13. Dietas vegetarianas Las dietas vegetarianas pueden proporcionar altas concentraciones de antioxidantes y un perfil lipídico que puede ayudar a prevenir la enfermedad coronaria. No obstante, puede haber algunos problemas asociados. Se tomaron muestras de un gran grupo de voluntarios que eran vegetarianos estrictos (sin productos animales), lactovegetarianos (vegetarianos que toman productos lácteos) u omnívoros (individuos con una dieta variada normal que incluye la carne). En cada caso, los voluntarios habían seguido la dieta durante varios años. Las concentraciones sanguíneas de homocisteína y metilmalonato estaban elevadas en el grupo de vegetarianos estrictos, algo menores en el grupo de lactovegetarianos y mucho menor en el grupo omnívoro. Explíquelo.

14. Anemia perniciosa La carencia de vitamina B_{12} puede aparecer en unas enfermedades genéticas raras que conducen a niveles bajos de B_{12} a pesar de una dieta normal que incluía fuentes cárnicas y lácteas ricas en B_{12}. Esta enfermedad no puede tratarse con suplementos de B_{12} en la dieta. Explíquelo.

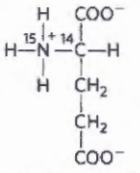
15. Mecanismos de reacción del piridoxal fosfato La treonina se puede descomponer por el enzima treonina deshidratasa que cataliza la conversión de treonina en α-cetobutirato y amoníaco. El enzima utiliza PLP como cofactor. Sugiera un mecanismo para esta reacción, basado en los mecanismos

Copy Station

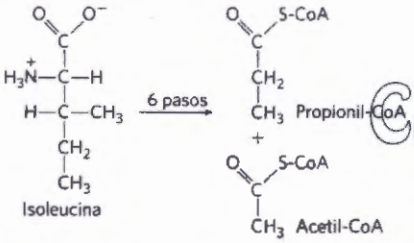
de la Figura 18-6. Observe que esta reacción incluye una eliminación en el carbono β de la treonina



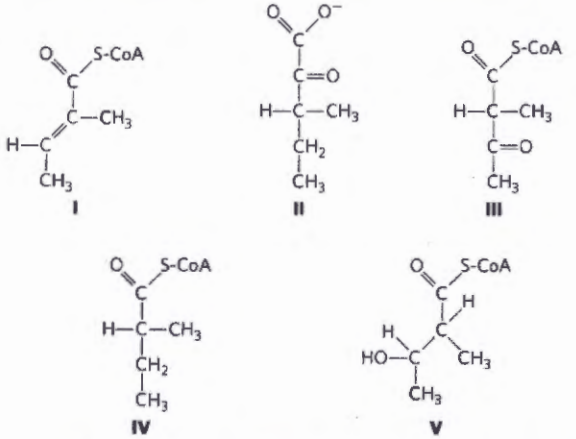
16. Rutas del carbono y del nitrógeno en el metabolismo del glutamato Cuando se degrada oxidativamente [2-^{14}C,^{15}N] glutamato en el hígado de una rata ¿en qué átomos de los siguientes metabolitos se encontrará cada isótopo? (a) urea (b) succinato (c) arginina (d) citrulina (e) ornitina (f) aspartato?



17. Estrategia química del catabolismo de la isoleucina La isoleucina se degrada en una serie de seis pasos a propionil-CoA y acetil-CoA:



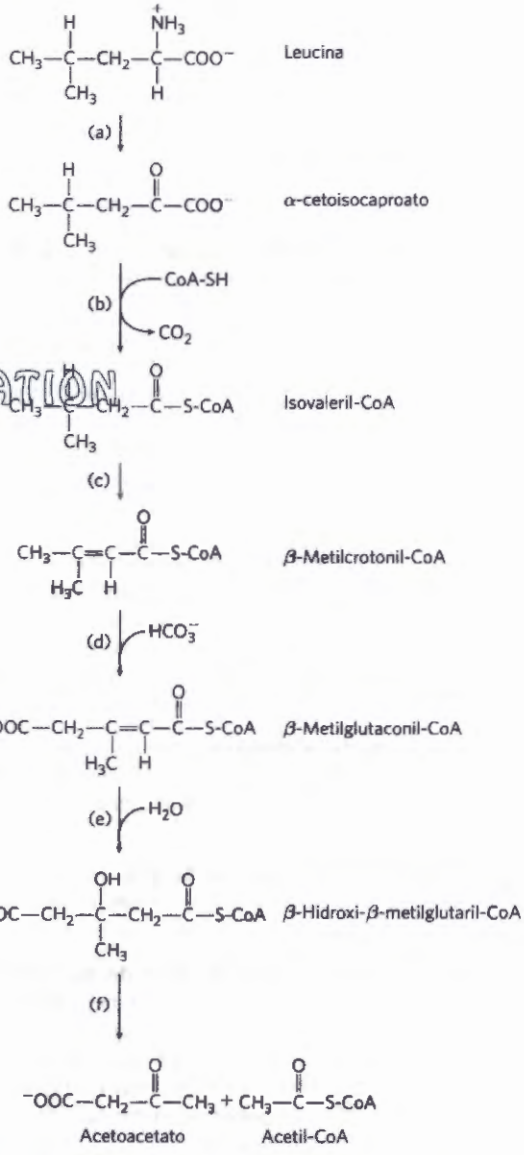
(a) El proceso químico de degradación de la isoleucina incluye estrategias análogas a las utilizadas en el ciclo del ácido cítrico y en la β-oxidación de ácidos grasos. Los intermediarios de la degradación de la isoleucina (I a V) que se muestran a continuación no están en el orden correcto. Utilice su conocimiento y comprensión del ciclo del ácido cítrico y de la ruta de la β-oxidación para ordenar los intermediarios en la secuencia metabólica adecuada para la degradación de la isoleucina.



(b) Para cada paso propuesto, describa el proceso químico, dé un ejemplo análogo del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de la β-oxidación (donde sea posible), e indique los cofactores necesarios.

18. Papel del piridoxal fosfato en el metabolismo de la glicina El enzima serina hidroximetiltransferasa requiere piridoxal fosfato como cofactor. Proponga un mecanismo para la reacción catalizada por este enzima, en la dirección de degradación de la serina (producción de glicina). (Sugerencia: Vea las Figs. 18-19 y 18-20b).

19. Rutas paralelas de la degradación de aminoácidos y de ácidos grasos El esqueleto carbonado de la leucina se degrada mediante una serie de reacciones análogas a las del ciclo del ácido cítrico y de la β-oxidación. Para cada reacción, de (a) hasta (f), mostradas a continuación, indique su tipo, proporcione un ejemplo análogo del ciclo del ácido cítrico o de la ruta de la β-oxidación (donde sea posible), e indique los cofactores necesarios.



COPY-STATION

20. Tratamiento de una enfermedad genética Los controles dietéticos estrictos necesarios para hacer frente al progreso de la enfermedad del jarabe de arce en la orina son difíciles de seguir toda la vida por lo que los pacientes

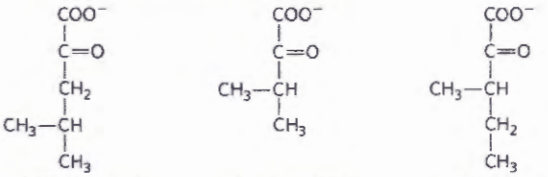
pueden experimentar un control metabólico deficiente que conduce a síntomas neurológicos. En estos casos, el tratamiento puede implicar un transplante de órgano de un donante adecuado. El trasplante de órganos supone un riesgo considerable, pero el éxito puede aliviar mucho esta enfermedad metabólica y reducir la necesidad de restricciones dietéticas. ¿Qué órgano se podría trasplantar para conseguir este efecto y por qué?

Problema de análisis de datoss

21. Enfermedad del jarabe de arce en la orina En la Figura 18-28 se muestra la ruta de degradación de los aminoácidos de cadena ramificada y el sitio del defecto bioquímico que produce la enfermedad del jarabe de arce en la orina. Los hallazgos iniciales que condujeron finalmente al descubrimiento del defecto en esta enfermedad se presentaron en tres artículos publicados a finales de la década de 1950 y principios de la década de 1960. Este problema sigue la historia de los hallazgos desde las observaciones clínicas iniciales hasta la propuesta de un mecanismo bioquímico.

Menkes, Hurst y Craig (1954) presentaron los casos de cuatro hermanos, todos ellos muertos con un conjunto de síntomas similares. En los cuatro casos tanto el embarazo de la madre como el parto habían sido normales. Los primeros 3 a 5 días de la vida de los niños también fueron normales. Pero poco después cada niño empezó a tener convulsiones y los niños murieron entre los 11 días y los 3 meses de edad. La autopsia mostró una hinchazón considerable del cerebro en todos los casos. La orina de los niños tenían un fuerte olor inusual, de "jarabe de arce", que empezaba a partir del tercer día de vida.

Menkes (1959) publicó datos recogidos de otros seis niños. Todos mostraban síntomas similares a los antes descritos y murieron entre los 15 días y los 20 meses después del nacimiento. En un caso Menkes pudo obtener muestras de orina durante los últimos meses de vida del lactante. Cuando trató la orina con 2,4-dinitrofenilhidrazona, que forma precipitados coloreados con los compuestos cetónicos encontró los tres α-cetoácidos en cantidades inusualmente elevadas:

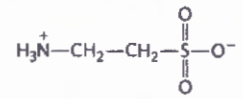


α-Cetoisocaproato α-Cetoisovalerato α-Ceto-β-metil-η-valerato

(a) Estos α-cetoácidos se producen por desaminación de aminoácidos. Para cada uno de los α-cetoácidos antes mostrados, dibuje y nombre el aminoácido del que procede.

Dancis, Levis y Westall (1960) recogieron datos adicionales que los llevaron a proponer el defecto bioquímico mostrado en la Figura 18-28. En un caso examinaron un paciente cuya orina presentó por primera vez el olor a jarabe de arce a los 4 meses de edad. A los 10 meses (marzo de 1956) se ingresó el niño en el hospital porque tenía fiebre y mostraba un gran retraso en el desarrollo motor. A los 20 meses (enero de1957), volvió a ingresar encontrándose los síntomas neurológicos degenerativos ya vistos en casos previos de enfermedad del jarabe de arce en la orina; murió poco después. En la tabla de la página 708 se muestran los resultados de sus análisis de sangre y orina, junto con los valores normales de cada componente.

(b) En la tabla se incluye la taurina, aminoácido que normalmente no se encuentra en las proteínas. La taurina se produce a menudo como subproducto de lesiones celulares. Su estructura es:



COPYSTATION

	Concentración en orina (mg/24 h)			Concentración en plasma (mg/ml)	
	Normal	Paciente		Normal	Paciente
Aminoácido		Mar. 1956	Ene. 1957		Ene.1957
Alanina	5–15	0,2	0,4	3,0–4,8	0,6
Asparagina y glutamina	5–15	0,4	0	3,0–5,0	2,0
Ácido aspártico	1–2	0,2	1,5	0,1–0,2	0,04
Arginina	1,5–3	0,3	0,7	0,8–1,4	0,8
Cistina	2–4	0,5	0,3	1,0–1,5	0
Ácido glutámico	1,5–3	0,7	1,6	1,0–1,5	0,9
Glicina	20–40	4,6	20,7	1,0–2,0	1,5
Histidina	8–15	0,3	4,7	1,0–1,7	0,7
Isoleucina	2–5	2,0	13,5	0,8–1,5	2,2
Leucina	3–8	2,7	39,4	1,7–2,4	14,5
Lisina	2–12	1,6	4,3	1,5–2,7	1,1
Metionina	2–5	1,4	1,4	0,3–0,6	2,7
Ornitina	1–2	0	1,3	0,6–0,8	0,5
Fenilalanina	2–4	0,4	2,6	1,0–1,7	0,8
Prolina	2–4	0,5	0,3	1,5–3,0	0,9
Serina	5–15	1,2	0	1,3–2,2	0,9
Taurina	1–10	0,2	18,7	0,9–1,8	0,4
Treonina	5–10	0,6	0	1,2–1,6	0,3
Triptófano	3–8	0,9	2,3	No medido	0
Tirosina	4–8	0,3	3,7	1,5–2,3	0,7
Valina	2–4	1,6	15,4	2,0–3,0	13,1

(c) Basándose en su estructura y la información contenida en este capítulo ¿cuál es el aminoácido con más probabilidades de ser el precursor de la taurina? Razónelo.

En comparación con los valores normales dados en la tabla, ¿qué aminoácidos mostraron niveles significativamente elevados en la sangre del paciente en enero de 1957? ¿cuáles en la orina del paciente?

Basándose en sus resultados y en su conocimiento de la ruta mostrada en la Figura 18-28, Dancis y colaboradores concluyeron: "aunque a los autores les parece muy probable que el bloqueo primario se encuentra en la ruta degradativa de los aminoácidos de cadena ramificada, esto no puede quedar establecido de manera absoluta".

(d) ¿De qué modo los datos aquí presentados apoyan esta conclusión?

(e) ¿Qué datos aquí presentados *no* se ajustan a este modelo de la enfermedad del jarabe de arce en la orina? ¿Cómo explica estos datos aparentemente contradictorios?

(f) ¿Qué datos necesitaría para estar más seguro de su conclusión?

Referencias

Yu, W., X. Liang, R. Ensenauer, J. Vockley, L. Sweetman, and H. Schultz. 2004. Leaky β-oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* 279:52,160–52,167.

Menkes, J.H., P.L. Hurst, and J.M. Craig. 1954. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* **14**:462–466.(Tabla)

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 19

Fosforilación oxidativa

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

19.1 La cadena respiratoria mitocondrial 708

19.2 Síntesis de ATP 724

19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa 736

19.4 Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis 740

19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de las mutaciones 741

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía (catabolismo) en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa da cuenta de la mayor parte del ATP sintetizado por la mayoría de organismos no fotosintéticos en la mayor parte de circunstancias. En eucariotas, ls fosforilación oxidativa tiene lugar en las mitocondrias en donde intervienen enormes complejos proteicos incrustados en las membranas mitocondriales. La ruta de la síntesis del ATP en mitocondrias ha sido un reto fascinante para los bioquímicos durante la mayor parte del siglo XX.

Nuestros conocimientos actuales sobre la síntesis del ATP en la mitocondria se basan en la teoría, introducida por Peter Mitchell en 1961, según la cual las diferencias transmembrana en la concentración de protones son el reservorio de la energía obtenida a partir de las reacciones biológicas de oxidación. Esta **teoría quimiosmótica** está actualmente aceptada como uno de los grandes principios unificadores de la biología del siglo XX. Proporciona un conocimiento de los procesos de la fosforilación oxidativa y de la fotofosforilación en plantas así como sobre transducciones de energía aparentemente tan dispares como son el transporte activo a través de membranas y el movimiento de los flagelos bacterianos.

El mecanismo de la fosforilación oxidativa tiene tres componentes definitorios **(Fig. 19-1)**. (1) Los electrones fluyen desde dadores electrónicos (sustratos oxidables) a través de una cadena de transportadores ligados a membrana hasta un aceptor electrónico final con un gran potencial de reducción (oxígeno molecular, O_2) (2) La energía libre puesta a disposición por este flujo de electrones "cuesta abajo" (exergónico) está acoplada al transporte "cuesta arriba" de protones a través de una membrana impermeable a los protones, conservándose la energía libre de oxidación de los combustibles en forma de potencial electroquímico transmembrana. (3) El flujo transmembrana de protones a favor de su gradiente de concentración mediante canales proteicos específicos proporciona la energía libre para la síntesis de ATP, catalizada por un

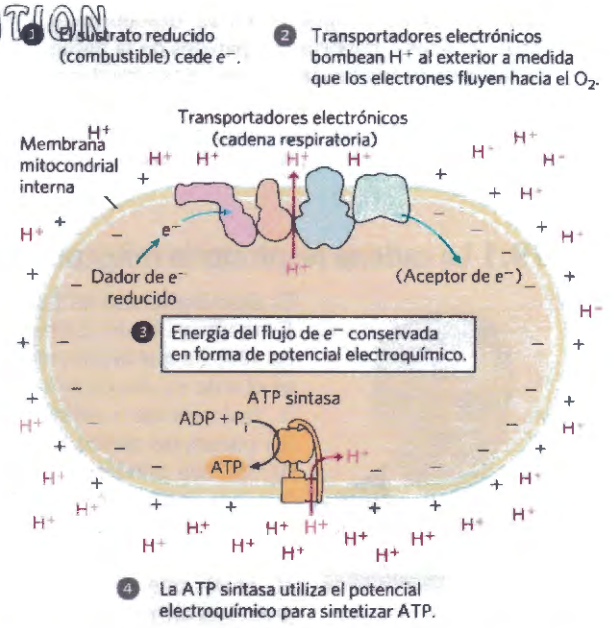


FIGURA 19-1 Mecanismo quimiosmótico de la síntesis de ATP en mitocondrias. Los electrones se desplazan espontáneamente a través de una cadena de transportadores ligados a membrana, la cadena respiratoria, impulsados por el elevado potencial de reducción del oxígeno y los potenciales de reducción relativamente bajos de los diversos sustratos reducidos (combustibles) que experimentan oxidación en la mitocondria. El flujo de electrones crea un potencial electroquímico por el movimiento transmembrana de protones y cargas positivas. Este potencial electroquímico impulsa la síntesis de ATP por una ATP sintasa ligada a membrana que es fundamentalmente similar en mitocondrias y cloroplastos así como en bacterias y arquebacterias.

complejo proteico asociado a la membrana (la ATP sintasa) que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ADP.

El capítulo empieza con la descripción de los componentes de la cadena de transferencia electrónica (la cadena respiratoria) y su organización en forma de grandes complejos funcionales en la membrana mitocondrial interna, la ruta del flujo electrónico a través de estos complejos y el movimiento de protones asociado a dicho flujo. Pasaremos revista a continuación al extraordinario complejo enzimático que, mediante "catálisis rotacional", captura la energía del flujo de protones en forma de ATP. Continuaremos con los mecanismos reguladores que coordinan la fosforilación oxidativa con las muchas rutas catabólicas en las que los combustibles son oxidados.

El papel metabólico de la mitocondria es tan crítico para la función celular, y también para el organismo, que aparecen graves problemas médicos como consecuencia de defectos en la función mitocondrial. Las mitocondrias son básicas para las funciones neuronal y muscular así como para la regulación del metabolismo energético y del peso corporal del organismo entero. Se acepta que las enfermedades neurodegenerativas, así como el cáncer, la diabetes y la obesidad son un posible resultado de una función mitocondrial defectuosa, y existe una teoría del envejecimiento basada en la pérdida gradual de la integridad mitocondrial. La producción de ATP no es la única función mitocondrial importante; las mitocondrias también intervienen en la termogénesis, la síntesis de esteroides y la apoptosis (muerte celular programada). El descubrimiento de estos variados e importantes papeles de la mitocondria ha estimulado muchas investigaciones actuales sobre la bioquímica de este orgánulo. Discutiremos estas funciones diversas de las mitocondrias y las consecuencias de una función mitocondrial defectuosa en los seres humanos.

19.1 La cadena respiratoria mitocondrial



Albert L. Lehninger, 1917-1986 [Fuente: Alan Mason Chesney Medical Archives of the Johns Hopkins Medical Institutions.]

El descubrimiento de Eugene Kennedy y Albert Lehninger en 1948 de que la mitocondria es el sitio en donde se realiza la fosforilación oxidativa en los eucariotas marcó el inicio de la fase moderna de los estudios enzimológicos sobre las transducciones biológicas de energía. Las mitocondrias, al igual que las bacterias gram-negativas, tienen dos membranas **(Fig. 19-2a)**. La membrana mitocondrial externa es fácilmente permeable a pequeñas moléculas (M_r<5.000) e iones, que se mueven libremente a través de canales transmembrana compuestos por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas. La membrana interna es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón (H^+); las únicas especies que cruzan esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos. La membrana interna aloja los componentes de la cadena respiratoria y la ATP sintasa.

La matriz mitocondrial, el espacio acotado por la membrana interna, contiene el complejo de la piruvato deshidrogenasa y los enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la ruta de la β-oxidación de los ácidos grasos y de las rutas de oxidación de los aminoácidos, es decir, todas las rutas de oxidación de combustibles excepto la glucólisis que tiene lugar en el citosol. Debido a la permeabilidad selectiva de la membrana mitocondrial interna, separa los intermediarios y enzimas de las rutas metabólicas citosólicas de los de los procesos metabólicos que se producen en la matriz. Sin embargo, el piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos o sus derivados α-ceto son llevados por transportadores específicos a la matriz para poder acceder a la maquinaria del ciclo del ácido cítrico. El ADP y el P_i son transportados específicamente al interior de la matriz al mismo tiempo que el recién sintetizado ATP es transportado al exterior. El mejor inventario actual de proteínas en las mitocondrias de mamíferos señala unas 1.100 de las que al menos 300 tienen funciones por ahora desconocidas.

La representación de una mitocondria en forma de habichuela de la Figura 19-2 es una simplificación, debida en parte a estudios iniciales en los que se observaban al micorsopio electrónico secciones delgadas de células. Las imágenes tridimensionales obtenidas, ya sea por reconstrucción de secciones seriadas o por microscopia confocal, revelan importantes variaciones en tamaño y forma. En células vivas teñidas con colorantes fluorescentes específicos de las mitocondrias, se ve una gran cantidad de mitocondrias de diferentes formas agrupadas alrededor del núcleo (véase la Fig. 19-2b).

Los tejidos con una gran demanda de metabolismo aeróbico (cerebro, músculos esquelético y cardíaco y ojo, por ejemplo) contienen muchos centenares o millares de mitocondrias por célula y, en general, las mitocondrias de células con actividad metabólica elevada tienen más crestas, y más densamente empaquetadas (Fig. 19-2c, d). Durante el crecimiento celular y la división, las mitocondrias, al igual que las bacterias, se dividen por fisión (como las bacterias) y en algunas circunstancias las mitocondrias individuales se fusionana para formar estructuras más grandes y extensas. Condiciones que producen estrés, tales como la presencia de inhibidores de la transferencia electrónica o mutaciones en un transportador electrónico, desencadenan la fisión mitocondrial y, a veces, la **mitofagia** (degradación de las mitocondrias yreciclado de los amiknoácidos, nucleótidos y lípidos liberados. Cuando desaparece el estrés, mitocondrias pequeñas y cortas se fusionan para formar orgánulos largos, delgados y tubulares.

Los electrones son canalizados hacia transportadores universales de electrones

La fosforilación oxidativa empieza con la entrada de los electrones en la serie de transportadores electrónicos denominada **cadena respiratoria**. La mayor parte de dichos electrones provienen de la acción de deshidrogenasas que captan electrones de vías catabólicas y los canalizan hacia aceptores universales de electrones: nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o $NADP^+$) o nucleótidos de flavina (FMN o FAD) (véanse las Figs. 13-24, 13-27).

Copy-Station

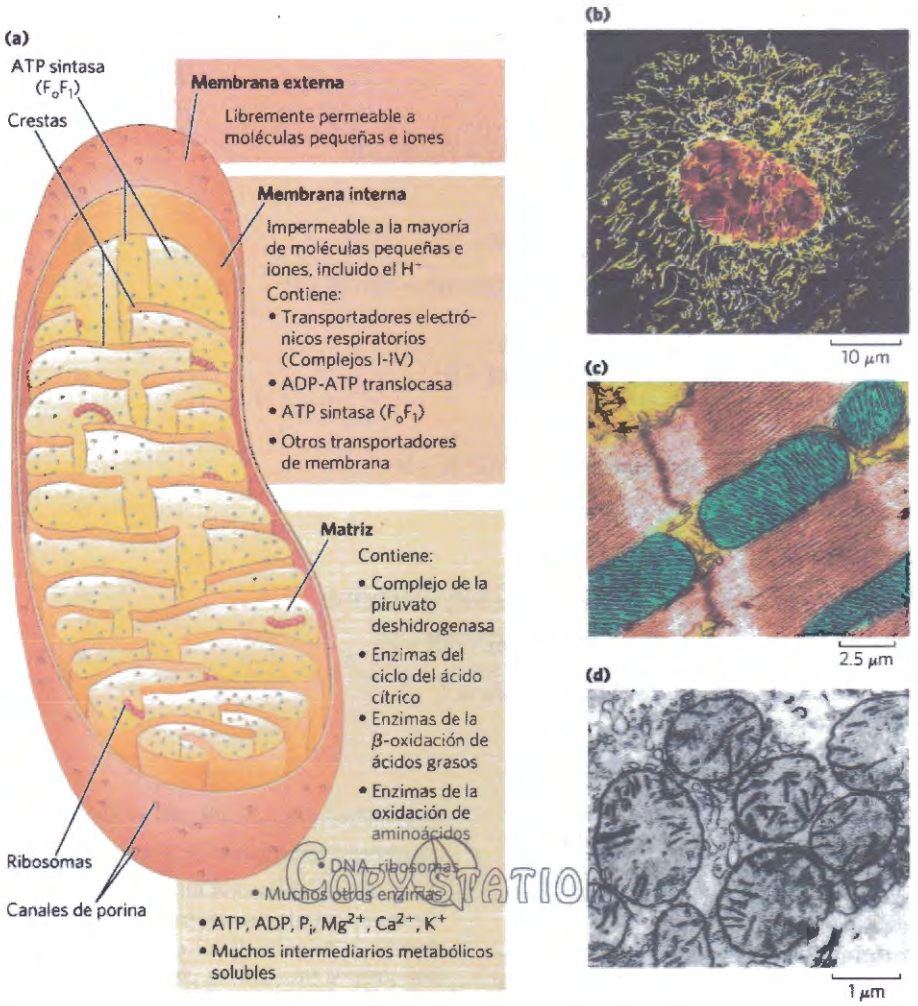


FIGURA 19-2 Anatomía bioquímica de una mitocondria. **(a)** La membrana externa tiene poros que la hacen permeable a pequeñas moléculas e iones pero no a proteínas. Los repliegues de la membrana interna, denominados crestas, le confieren una gran área superficial. La membrana interna de una sola mitocondria de hígado puede tener más de 10.000 conjuntos de sistemas de transferencia de electrones (cadenas respiratorias) y de moléculas de ATP sintasa, distribuidas por toda la superficie de la membrana. **(b)** Una célula animal típica tiene cientos o miles de mitocondrias. Esta célula endotelial de una arteria pulmonar bovina se tiñó con sondas fluorescentes para la actina (azul), para el DNA (rojo) y para las mitocondrias (amarillo). Obsérvese la variabilidad, en cuanto a la longitud, de las mitocondrias. **(c)** Las mitocondrias del músculo cardíaco (azules en la micrografía electrónica coloreada), con gran profusión de crestas y, por tanto, un área de la membrana interna mucho mayor, tienen más de tres veces el número de conjuntos de cadenas respiratorias que en **(d)**, las mitocondrias hepáticas. Las mitocondrias de músculo e hígado tienen el tamaño aproximado de una bacteria (1 a 10 μm de longitud). Las mitocondrias de invertebrados, plantas y microbios eucariotas son similares a la que se muestra aquí, si bien existe mucha variación en tamaño, forma y grado de repliegue de la membrana interna. [Fuentes: **(b)** Talley Lambert/Science Source. **(c)** Thomas Deerinck, NCMIR/Science Source. **(d)** Biophoto Associates/Science Source.]

Las **deshidrogenasas ligadas a nucleótidos de nicotinamida** catalizan reacciones reversibles de los tipos generales siguientes:

$$\text{Sustrato reducido} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{sustrato oxidado} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\text{Sustrato reducido} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{sustrato oxidado} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

La mayoría de deshidrogenasas que participan en el catabolismo son específicas para el NAD^+ como aceptor electrónico (Tabla 19-1). Algunas están localizadas en el citosol y otras en la mitocondria, existiendo también otras con isozimas, mitocondriales y citosólicos.

Las deshidrogenasas ligadas al NAD eliminan dos átomos de hidrógeno de sus sustratos. Uno es transferido en forma de ión hidruro ($:H^-$) al NAD^+ mientras que el otro aparece como H^+ en el medio (véase la Fig. 13-24). El NADH y el NADPH son transportadores electrónicos hidrosolubles que se asocian *reversiblemente* con deshidrogenasas. El NADH transporta los electrones que provienen de reacciones catabólicas a su punto de entrada en la cadena respiratoria, el complejo de la NADH deshidrogenasa que se describe más adelante. El NADPH generalmente suministra electrones a reacciones anabólicas. Las células mantienen resevas separadas de NADPH y NADH, con potenciales redox diferentes. Esto se consigue manteniendo las razones [forma reducida]/[forma oxidada] relativamente alta para el

TABLA 19-1 Algunas reacciones importantes catalizadas por deshidrogenasas ligadas a NAD(P)H

Reacción[a]	Localización[b]
Ligadas a NAD	
α-Cetoglutarato + CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ succinil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
L-Malato + $NAD^+ \rightleftharpoons$ oxalacetato + NADH + H^+	M y C
Piruvato + CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ acetil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	M
Gliceraldehído-3-fosfato + P_i + $NAD^+ \rightleftharpoons$ 1,3-bisfosfoglicerato+ NADH + H^+	C
Lactato + $NAD^+ \rightleftharpoons$ piruvato + NADH + H^+	C
β-Hidroxiacil-CoA + $NAD^+ \rightleftharpoons$ β-cetoacil-CoA+ NADH + H^+	M
Ligadas a NADP	
Glucosa-6-fosfato + $NADP^+ \rightleftharpoons$ 6-fosfogluconato + NADPH + H^+	C
L-Malato + $NADP^+ \rightleftharpoons$ piruvato + CO_2 + NADPH + H^+	C
Ligadas a NAD o NADP	
L-GLutamato + H_2O + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + NH_4^+ + NAD(P)H	M
Isocitrato + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + CO_2 + NAD(P)H + H^+	M y C

[a]Estas reacciones así como sus enzimas se tratan en los Capítulos 14 a 18.
[b]M indica mitocondria; C, citosol.

NADPH y relativamente baja para el NADH. Ni el NADH ni el NADPH pueden atravesar la membrana interna de la mitocondria, pero los electrones que transportan pueden ser lanzados a su través indirectamente, tal como veremos más adelante.

Las **flavoproteínas** contienen un nucleótido de flavina, FMN o FAD, fuertemente unido, a veces de manera covalente (véase la Fig. 13-27). El nucleótido de flavina oxidado puede aceptar un electrón (dando la forma de semiquinona) o dos (produciendo $FADH_2$ o $FMNH_2$). La transferencia electrónica se da gracias a que la flavoproteína tiene un potencial de reducción estándar superior al del compuesto oxidado. Recuerde que el potencial de reducción es una medida cuantitativa de la tendencia relativa de una especie química determinada para aceptar electrones en una reacción de oxidación-reducción. El potencial de reducción estándar de un nucleótido de flavina, a diferencia de lo que sucede con el NAD o el NADP, depende de la proteína a la que está asociado. Interacciones locales con grupos funcionales de la proteína distorsionan los orbitales electrónicos del anillo de flavina, con lo que varía la estabilidad relativa de las formas oxidada y reducida. El potencial de reducción estándar pertinente es, por tanto, el de la flavoproteína concreta, no el del FAD o FMN aislados, habiéndose de considerar al nucleótido de flavina como parte del sitio activo de la flavoproteína y no como un reactivo o producto en la reacción de transferencia electrónica. Debido a que las flavoproteínas pueden participar en transferencias de uno o de dos electrones, pueden actuar como intermedios entre reacciones en las que se ceden dos electrones (como sucede en las deshidrogenaciones) y en aquéllas en las que se acepta un solo electrón (como en la reducción de una quinona a hidroquinona descrita más adelante).

Copy-Station

Los electrones pasan a través de una serie de transportadores unidos a membrana

La cadena respiratoria mitocondrial consta de una serie de transportadores electrónicos que actúan secuencialmente, la mayoría de los cuales son proteínas integrales con grupos prostéticos capaces de aceptar y ceder uno o dos electrones. Hay tres tipos de transferencias electrónicas en la fosforilación oxidativa: (1) transferencia directa de electrones, tal como sucede en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+}; (2) transferencia de un átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$) y (3) transferencia de un ión hidruro ($:H^-$) portador de dos electrones. El término **equivalente de reducción** se utiliza para designar el equivalente de un electrón sencillo que se transfiere en una reacción de oxidación-reducción.

Además del NAD y de las flavoproteínas, hay otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que funcionan en la cadena respiratoria: una quinona hidrofóbica, denominada ubiquinona, y dos tipos diferentes de proteínas con hierro (citocromos y proteínas ferro-sulfuradas). La **ubiquinona** (también llamada **coenzima Q**, o sencillamente **Q**) es una benzoquinona liposoluble que contiene una cadena lateral isoprenoide larga **(Fig. 19-3)**. La ubiquinona puede aceptar un electrón transformándose en el radical semiquinona ($^{\cdot}QH$) o dos electrones formando ubiquinol (QH_2). Al igual que las flavoproteínas transportadoras es, por tanto, capaz de actuar como puente entre un dador de dos electrones y un aceptor de un electrón. Debido a que la ubiquinona es al mismo tiempo pequeña e hidrofóbica puede difundir libremente dentro de la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna y puede hacer de lanzadera de equivalentes de reducción entre otros transportadores electrónicos de la membrana menos móviles. Además, debido a que transporta tanto

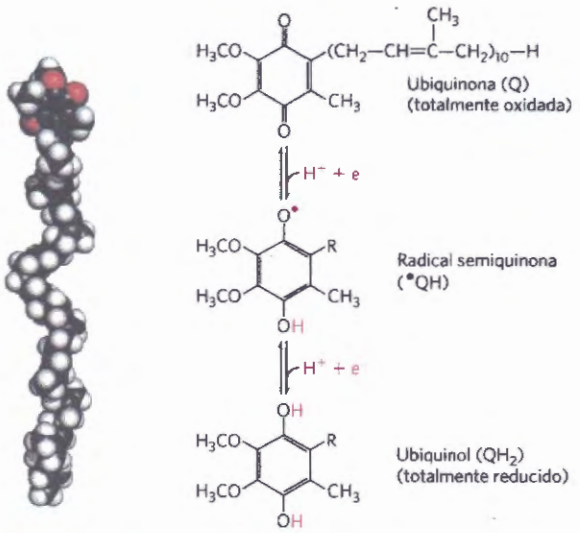


FIGURA 19-3 Ubiquinona (Q, o coenzima Q). La reducción completa de la ubiquinona requiere dos electrones y dos protones y se produce en dos pasos a través del radical semiquinona intermedio.

electrones como protones, juega un papel central en el acoplamiento del flujo electrónico al movimiento de protones.

Los **citocromos** son proteínas con una intensa absorción de la luz visible característica, debida a la presencia del grupo prostético hemo que contiene hierro **(Fig. 19-4a)**. Las mitocondrias contienen tres clases de citocromos que se distinguen por diferencias en su espectro de absorción de la luz y que se designan *a*, *b* y *c*. Cada tipo de citocromo en su estado reducido (Fe^{2+}) tiene tres bandas de absorción en el espectro visible (Fig. 19-4b). La banda de longitud de onda más larga está cerca de 600 nm en los citocromos del tipo *a*, cerca de 560 nm en los del tipo *b* y cerca de 550 nm en los del tipo *c*. Para distinguir entre citocromos de un tipo estrechamente relacionados, se utiliza en su nombre la absorción máxima exacta, tal como sucede con el citocromo b_{562}.

Los hemos de los citocromos *a* y *b* están unidos muy fuertemente, aunque no de manera covalente, a sus proteínas asociadas; los grupos hemo de los citocromos del tipo *c* están unidos de forma covalente a través de residuos Cys (Fig. 19-4). Al igual que con las flavoproteínas, el potencial de reducción estándar del átomo de hierro en el hemo de un citocromo depende de su interacción con las cadenas laterales de la proteí-

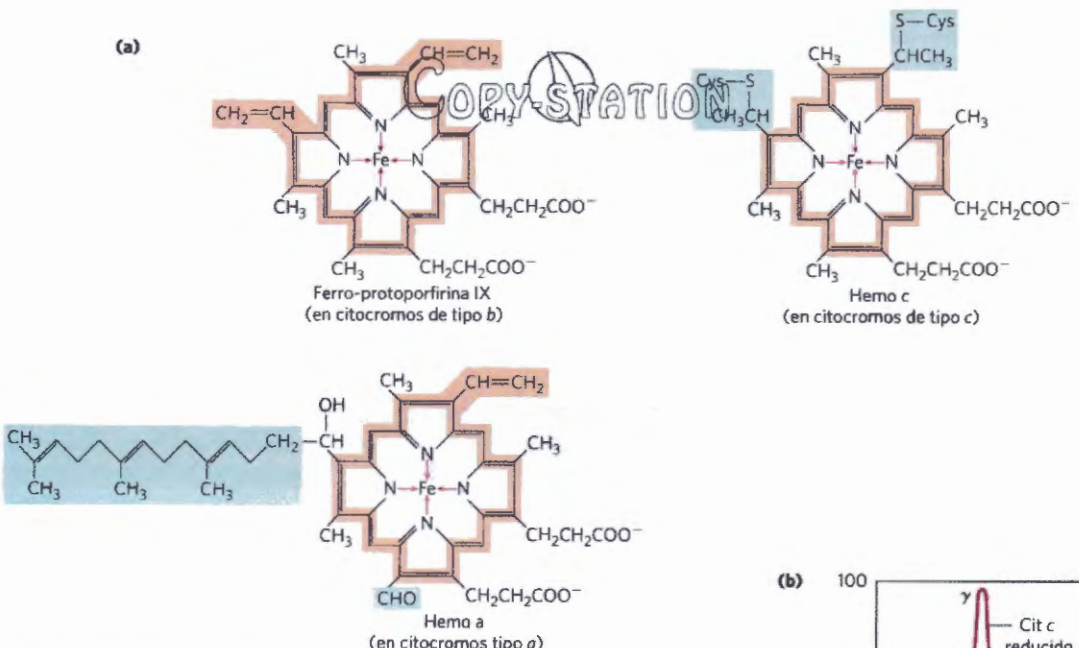


FIGURA 19-4 Grupos prostéticos de los citocromos. **(a)** Cada grupo está formado por cuatro anillos pentaatómicos que contienen nitrógeno en una estructura cíclica llamada porfirina. Los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un ión Fe central que puede ser Fe^{2+} o Fe^{3+}. La ferro-protoporfirina IX se encuentra en los citocromos de tipo *b* y en la hemoglobina y mioglobina (véase la Fig. 4-17). El hemo *c* está unido covalentemente a la proteína del citocromo *c* mediante enlaces tioéter con dos residuos Cys. El hemo *a*, que se encuentra en los citocromos de tipo *a*, tiene una cola isoprenoide larga unida a uno de los anillo pentaatómicos. El sistema de dobles enlaces conjugados (sombreado en rosa) del anillo de la porfirina tiene electrones π deslocalizados que son excitados de manera relativamente fácil por fotones con longitudes de onda correspondientes a la luz visible lo que explica la fuerte absorción de luz de la región visible del espectro por estos hemos (y compuestos relacionados). **(b)** Espectro de absorción del citocromo c (cit *c*) en sus formas oxidada (azul) y reducida (rojo). Se indican las bandas α, β y γ características de las formas reducidas.

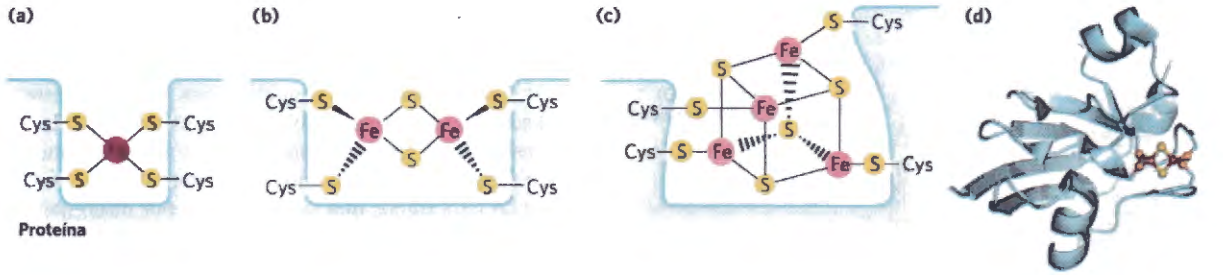


FIGURA 19-5 Centros ferro-sulfurados. Los centros Fe-S de las proteínas ferro-sulfuradas pueden ser tan sencillos como en **(a)**, con un solo ión Fe rodeado de átomos de S de cuatro residuos Cys; Fe está en rojo, ek S inorgánico es amarillo y los átomos de S de las Cys son naranja. En otros centros hay átomos de S inorgánicos y orgánicos de la Cys como **(b)** 2Fe-2S o **(c)** 4Fe-4S. **(d)** La ferredoxina de la cianobacteria *Anabaena* 7120 tiene un centro 2Fe-2S; (Observe que en estas designaciones sólo se cuentan los átomos de S inorgánicos. Por ejemplo, en el centro 2Fe-2S **(b)**, cada ión Fe está, de hecho, rodeado por cuatro átomos de S). El potencial de reducción estándar exacto del hierro en estos centros depende del tipo de centro y de los detalles de su interacción con la proteína asociada. [Fuente: PDB ID 1FRD. B. L. Jacobson et al., *Biochemistry* 32:6788, 1993.]

na, por lo que es diferente para cada citocromo. Los citocromos de los tipos *a* y *b* así como algunos del tipo *c* son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna. Una excepción sorprendente es el citocromo *c* que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la superficie exterior de la membrana mitocondrial interna.

En las **proteínas ferro-sulfuradas**, el hierro está presente no en forma de hemo sino en asociación con átomos de azufre inorgánico o con átomos de azufre de residuos Cys de la proteína, o con los dos al mismo tiempo. Estos centros ferro-sulfurados (Fe-S) van desde estructuras sencillas con un solo átomo de Fe coordinado a cuatro residuos Cys-SH a centros Fe-S más complejos con dos o cuatro átomos de Fe (**Fig. 19-5**). Las **proteínas ferro-sulfuradas de Rieske** (nombradas así porque las descubrió John S. Rieske) son una variante de las anteriores, en las que un átomo de Fe está coordinado con dos residuos His en lugar de con dos residuos Cys. Todas las proteínas ferro-sulfuradas participan en transferencias de un electrón en las que se oxida o reduce uno de los átomos de Fe de la agrupación ferro-sulfurada. En la transferencia de electrones mitocondrial actúan como mínimo ocho proteínas Fe-S. Los potenciales de reducción de las proteínas Fe-S varían de –0,65 V a +0,45 V, en función del microentorno del hierro en el interior de la proteína.

En la reacción global catalizada por la cadena respiratoria mitocondrial se transportan electrones desde el NADH, el succinato u otro dador electrónico primario a través de las flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferro-sulfuradas y citocromos y, finalmente, al O_2. Echar un vistazo a los métodos utilizados en la determinación de la secuencia de actuación de los transportadores es instructivo, dado que se han utilizado aproximaciones similares en el estudio de otras cadenas de transferencia electrónica, tales como las que tienen lugar en cloroplastos (véase la Fig. 20-16).

En primer lugar, se han determinado experimentalmente los potenciales de reducción estándar de los transportadores electrónicos individuales (Tabla 19-2). Es de esperar que los transportadores funcionen en orden de potenciales de reducción crecientes, porque los electrones tienden a fluir espontáneamente desde los transportadores de E'° más bajo hacia los transportadores con E'° más elevado. El orden de los transporta-

TABLA 19-2 Potenciales de reducción estándar de los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria y relacionados

Reacción redox (media reacción)	E'°(V)
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	–0,414
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH$	–0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADPH$	–0,324
NADH deshidrogenasa (FMN)+ $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH deshidrogenasa ($FMNH_2$)	–0,30
Ubiquinona $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol	0,045
Citocromo *b* (FE^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *b* (FE^{2+})	0,077
Citocromo c_1 (FE^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo c_1 (FE^{2+})	0,22
Citocromo *c* (FE^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *c* (FE^{2+})	0,254
Citocromo *a* (FE^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo *a* (FE^{2+})	0,29
Citocromo a_3 (FE^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo a_3 (FE^{2+})	0,35
$½O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$	0,817

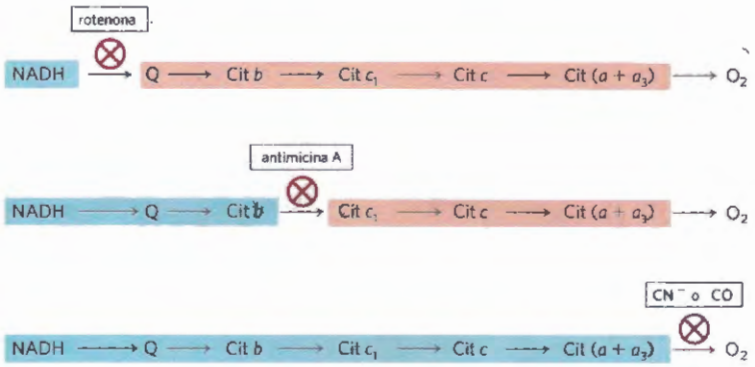


FIGURA 19-6 Método para determinar la secuencia de transportadores electrónicos. Este método mide el efecto de inhibidores de la transferencia electrónica sobre el estado de oxidación de cada transportador. En presencia de un dador electrónico y O_2, cada inhibidor da lugar a un patrón característico de transportadores oxidados/reducidos: los anteriores al bloqueo quedan reducidos (azul) mientras que los posteriores al bloqueo quedan oxidados (rojo).

dores deducido según este método es NADH→ Q → citocromo *b* → citocromo c_1 → citocromo c → citocromo *a* → citocromo a_3 → O_2. Observe, sin embargo, que el orden de los potenciales de reducción estándar no es necesariamente el mismo que el de los potenciales de reducción *reales* en condiciones celulares, que dependen de las concentraciones de las formas oxidadas y reducidas (véase la Ec. 13-5, p. 520). Un segundo método para determinar la secuencia de los transportadores electrónicos consiste en reducir experimentalmente la cadena de transportadores completa aportando una fuente de electrones en ausencia de un aceptor de electrones (sin O_2). Cuando se introduce O_2 de repente en el sistema, la velocidad a la que se oxida cada transportador, determinada espectroscópicamente, muestra el orden en el que funcionan los transportadores. El transportador más próximo al O_2 (al final de la cadena) es el primero en ceder sus electrones, el segundo transportador desde el final es el siguiente en oxidarse y así sucesivamente. Este tipo de experimentos ha confirmado la secuencia deducida a partir de los potenciales de reducción estándar.

En una confirmación final, se han utilizado agentes que inhiben el flujo de electrones a través de la cadena en combinación con medidas del grado de oxidación de cada transportador. En presencia de O_2 y un dador electrónico los transportadores que funcionan antes del paso inhibido quedan totalmente reducidos mientras que los que funcionan después del bloqueo están completamente oxidados **(Fig. 19-6)**. Mediante la utilización de diversos inhibidores que bloquean diferentes puntos de la cadena se ha deducido la secuencia completa; es la misma que la predicha según los dos métodos anteriores.

Los transportadores de electrones actúan en complejos multienzimáticos

Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria están organizados en complejos supramoleculares incrustados en membranas que se pueden separar físicamente. El tratamiento suave de la membrana mitocondrial interna con detergentes permite la resolución de cuatro complejos distintos de transportadores electrónicos, cada uno de los cuales es capaz de catalizar la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena (Tabla 19-3; **Fig. 19-7**). Los Complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona a partir de dos dadores electrónicos diferentes: NADH (Complejo I) y succinato (Complejo II). El Complejo III transporta electrones desde la ubiquinona reducida al citocromo *c*, y el Complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo *c* al O_2.

Abordaremos a continuación con mayor detalle la estructura y la función de cada complejo de la cadena respiratoria mitocondrial.

COPY STATION

TABLA 19-3 Componentes proteicos de la cadena respiratoria mitocondrial

Complejo enzimático/proteína	Masa (kDa)	Número de subunidades[a]	Grupo(s) prostético(s)
I NADH deshidrogenasa	850	45 (14)	FMN, Fe-S
II Succinato deshidrogenasa	140	4	FAD, Fe-S
III Ubiquinona-citocromo *c* oxidorreductasa[b]	250	11	Hemos, Fe-S
Citocromo c[c]	13	1	Hemos
IV Citocromo oxidasa[b]	204	13 (3-4)	Hemos, Cu_A, Cu_B

[a]Número de subunidades de los equivalentes bacterianos en paréntesis.

[b]Los datos de masa y subunidades corresponde a la forma monomérica.

[c]Observe que el citocromo *c* no es parte de un complejo enzimático; se desplaza entre los Complejos III y IV como una proteína soluble.

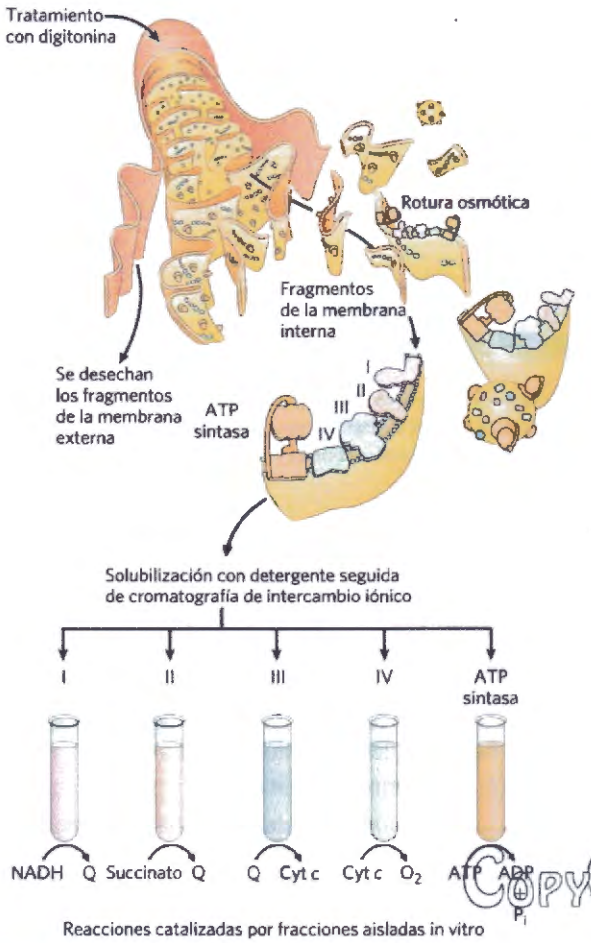


FIGURA 19-7 Resolución de los complejos funcionales de la cadena respiratoria. Se elimina primero la membrana mitocondrial externa por tratamiento con el detergente digitonina. A continuación se obtienen fragmentos de la membrana interna por rotura osmótica de la mitocondria disolviéndose suavemente los fragmentos en un segundo detergente. La mezcla resultante de proteínas de la membrana interna se resuelve mediante cromatografía de intercambio-iónico en varios complejos (I a IV) de la cadena respiratoria, cada uno con su composición proteica distintiva (véase la Tabla 19-3), y en el enzima ATP sintasa (a veces llamado Complejo V). Los Complejos I a IV aislados catalizan transferencias entre dadores (NADH y succinato), transportadores intermedios (Q y citocromo *c*) y O_2 tal como se muestra. In vitro, la ATP sintasa sólo tiene actividad hidrolizadora del ATP (ATPasa) y no sintetizadora de ATP.

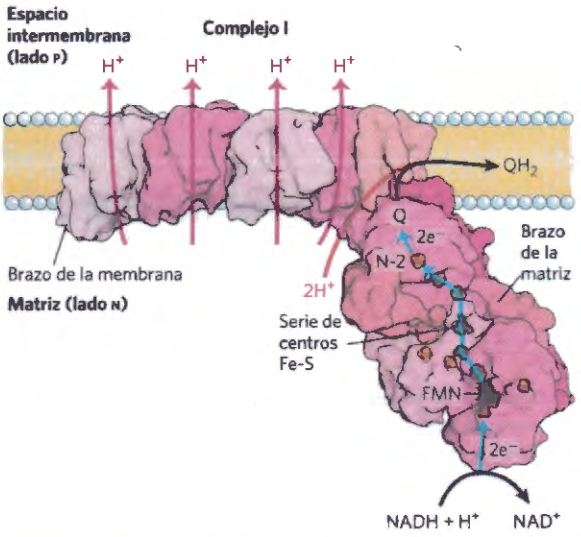


FIGURA 19-8 Estructura del Complejo I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa). El Complejo I (Aquí se muestra la estructura cristalina del procedente de *Thermus thermophilus*) cataliza la transferencia de un ión hidruro desde el NADH al FMN, y del FMN pasan dos electrones a través de una serie de centros Fe-S al centre Fe-S de N-2 situada en el brazo del complejo orientado hacia la matriz. La transferencia de electrones desde N-2 a la ubiquinona, que se encuentra en el brazo situado en la membrana, genera QH_2, el cual difunde por la bicapa lipídica. Esta transferencia de electrones también promueve la expulsión desde la matriz de cuatro protones por par de electrones. El flujo de protones produce un potencial electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna (n lado negativo, p lado positivo). El mecanismo detallado por el que se acopla la transferencia de electrones y de protones en el Complejo I todavía no se conoce, pero tres de las subunidades de la membrana están relacionadas estructuralmente a un cotransportador antiparalelo Na^+-H^+ y la ruta del movimiento de protones puede ser similar en ambos casos. La cuarta posible ruta de los protones es a través de una subunidad integral más próxima al sitio de unión de Q. Una hélice larga (no visible en esta vista) que yace a lo largo de la superficie del brazo de la membrana puede coordinar la acción de las cuatro bombas de protones cuando Q está reducido. [Fuente: PDB ID r4HEA, B. Baradaran et al., *Nature* 494:443, 3013.]

COPY-STATION

Complejo I: NADH a ubiquinona En los mamíferos el **Complejo I**, también llamado **NADH:ubiquinona oxidorreductasa** o **NADH deshidrogenasa,** es un enzima enorme compuesto por 45 cadenas polipeptídicas diferentes, entre las que se encuentra una flavoproteína que contiene FMN y como mínimo 8 centros ferro-sulfurados. El Complejo I tiene forma de L, con un brazo incrustado en la membrana interna y el otro prolongándose hacia la matriz. Estudios comparativos del Complejo I en bacterias y otros organismos muestran que 7 polipéptidos en el brazo de la membrana y 7 en la matriz están conservados y son esenciales **(Figura 19-8).**

El Complejo I cataliza dos procesos simultáneos forzosamente acoplados: (1) la transferencia exergónica hacia la ubiquinona de un ión hidruro del NADH y un protón de la matriz expresado por:

$$NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 \qquad (19\text{-}1)$$

y (2) la transferencia endergónica de cuatro protones desde la matriz al espacio intermembrana. En este proceso se desplazan protones contra un gradiente de protones transmembrana. Por tanto, el Complejo I es una bomba de protones impulsada por la energía de la transferencia electrónica, y la reacción que cataliza es **vectorial**: mueve los protones en una dirección específica desde una localización (la matriz, que se carga negativamente con la salida de los protones) a otra (el espacio intermembrana, que se carga positivamente). Para resaltar la naturaleza vectorial del proceso, la reacción global se expresa a menudo con subíndices que indican la localización de los protones: p para la cara positiva de la membrana interna (el espacio intermembrana) y n para la cara negativa (la matriz):

$$NADH + 5H^+_N + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_P \qquad (19\text{-}2)$$

TABLA 19-4 Agentes que interfieren con la fosforilación oxidativa

Tipo de interferencia	Compuesto[a]	Diana/modo de acción
Inhibición de la transferencia electrónica	Cianuro, Monóxido de carbono	Inhibe la citocromo oxidasa
	Antimicina A	Bloquea la transferencia electrónica desde el citocromo *b* al citocromo c_1
	Mixotiazol, Rotenona, Amital, Piericidina A	Impide la transferencia electrónica desde un centro Fe-S a la ubiquinona
Inhibición de la ATP sintasa	Aurovertina	Inhibe F_1
	Oligomicina, Venturicidina	Inhibe F_o y CF_o
	DCCD	Bloquea el flujo de protones a través de F_o
Desacoplamiento de la fosforilación y el transporte electrónico	FCCP, DNP	Transportadores protónicos hidrofóbicos
	Valinomicina	Ionóforo del K^+
	Proteína desacoplante 1	Forma poros conductores de protones en la membrana interna de la mitocondrias del tejido adiposo marrón
Inhibición del intercambio ATP-ADP	Atractilósido	Inhibe la nucleótido de adenina translocasa

[a]DCCD, diciclohexilcarbodiimida; FCCP, cianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona; DNP, 2,4-dinitrofenol.

COPY-STATION

El amital (un barbiturato), la rotenona (producto vegetal utilizado habitualmente como insecticida) y el antibiótico piericidina A inhiben el flujo electrónico desde los centros Fe-S del Complejo I a la ubiquinona (Tabla 19-4), con el consecuente bloqueo del proceso global de la fosforilación oxidativa.

Tres de las siete subunidades proteicas integrales del brazo de la membrana están relacionadas con un cotransportador antiparalelo Na^+-H^+ y se cree que son responsables del bombeo de tres protones; una cuarta subunidad en el brazo de la membrana, la más cercana al sitio de fijación de Q, es responsable probablemente del bombeo del cuarto protoón (Fig. 19-8).

¿Cómo se acopla la reducción de la ubiquinona con el bombeo de protones? La reducción de Q tiene lugar lejos del brazo de la membrana de la proteína, donde se produce el bombeo de protones, por lo que el acoplamiento es claramente indirecto. Probablemente, la reducción de Q induce un cambio conformacional de largo alcance en el Complejo I. La imagen de alta resolución del Complejo I a partir de estudios cristalográficos sugiere un posible mecanismo de acoplamiento: una hélice larga que se encuentra a lo largo del brazo de la membrana puede transmitir cambios alostéricos a través de este brazo. Parece probable que los cuatro protones se bombeen de manera simultánea, por lo que la energía de una reacción fuertemente exergónica (la reducción de Q) se rompa en pequeños paquetes, una estrategia común empleadas por los organismos vivos.

Complejo II: Succinato a ubiquinona En el Capítulo 16 ya encontramos el **Complejo II** bajo un nombre diferente: **succinato deshidrogenasa**; es el único enzima del ciclo del ácido cítrico ligado a membrana. El Complejo II acopla la oxidación del succinato en un sitio con la reducción de la ubiquinona en otro sitio alejado del primero unos 40Å. Aunque más pequeño y más sencillo que el Complejo I, el Complejo II contiene cinco grupos prostéticos de dos tipos y cuatro subunidades proteicas diferentes **(Fig. 19-9)**. Las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana, cada una de ellas con tres hélices transmembrana. Contienen un grupo hemo, hemo *b*, y un sitio de unión para Q que es el aceptor final de electrones en la reacción catalizada por el Complejo II. Las subunidades A y B se extienden hacia la matriz; contienen tres centros 2Fe-2S, FAD unido y un sitio de unión para el sustrato succinato. Aunque la ruta global de transferencia de electrones es larga (desde el sitio de unión del succinato al FAD, a continuación a través de los centros Fe-S hasta al sitio de unión de Q), ninguna de las distancias de transferencia electrónica individuales excede unos 11 Å, una distancia razonable para una transferencia electrónica rápida (Fig. 19-9). La transferencia de electrones a través del Complejo II no va acompañada de bombeo de protones a través de la membrana interna, aunque el QH_2 producido por la oxidación del succinato será utilizado por el Complejo III para impulsar la transferencia protónica. Debido a que el Complejo II funciona en el ciclo del ácido cítrico, los factores que afectan su actividad (tales como la disponibilidad de Q oxidado) sirven, probablemente, para coordinar dicho ciclo con la transferencia electrónica mitocondrial.

El hemo *b* del Complejo II no se encuentra, aparentemente, en la ruta directa de transferencia

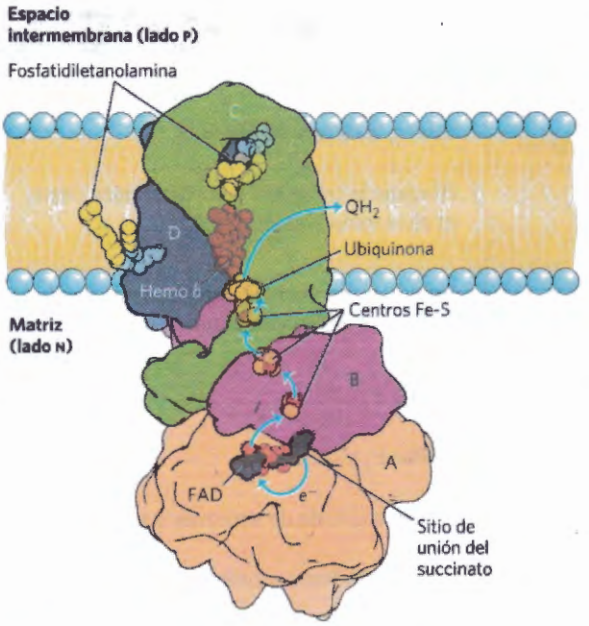


FIGURA 19-9 Estructura del Complejo II (succinato deshidrogenasa). Este complejo (porcino) tiene dos subunidades transmembrana, C y D y las subunidades A y B se extienden hacia la matriz. Inmediatamente detrás del FAD de la subunidad A se encuentra el sitio de unión del succinato. La subunidad B tiene trescentros Fe-S; la ubiquinona está unida a la subunidad B y el hemo *b* está entremedio de las subunidades C y D. Dos moléculas de fosfatidlletanolamina están unidas de manera tan fuerte a la subunidad D que se observan en la estructura cristalina. Los electrones se desplazan (flechas azules) desde el succinato al FAD, seguidamente a través de los tres centros Fe-S a la ubiquinona. El hemo *b* no se encuentra en la ruta principal de transferencia de los electrones pero protege contra la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS) por electrones que se desvían en el camino. [Fuente: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell*, 121:1043, 2005.]

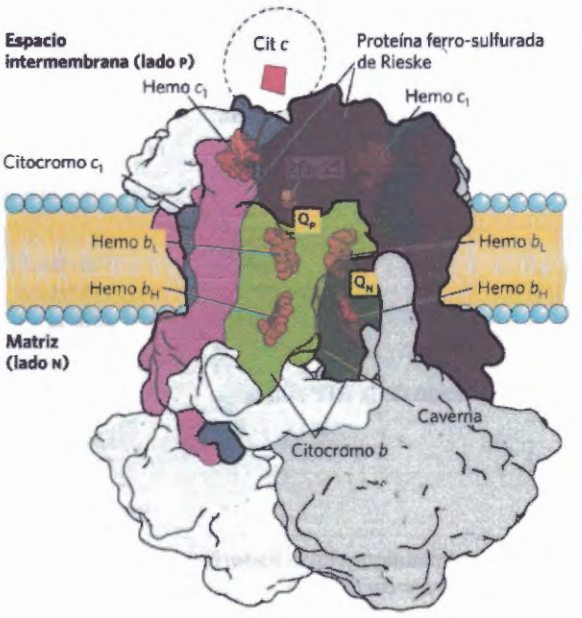


FIGURA 19-10 Estructura del Complejo III (complejo del citocromo bc_1). El complejo (bovino) es un dímero de monómeros idénticos, cada uno constituido por 11 subunidades diferentes. El núcleo funcional de cada monómero consta de tres subunidades: el citocromo *b* (en verde) con sus dos hemos (b_H y b_L); la proteína ferro-sulfurada de Rieske (púrpura) con sus centros 2Fe-2S y el citocromo c_1 (en azul) con su hemo. En esta ilustración esquemática se muestra como el citocromo c_1 y la proteína ferro-sulfurada de Rieske se proyectan desde la superficie p, y pueden interaccionar con el citocromo *c* del espacio intermembrana (aunque no forma parte del complejo funcional). El complejo presenta dos sitios de unión diferenciados para la ubiquinona, Q_N y Q_P, que son los sitios de inhibición por dos fármacos que bloquean la fosforilación oxidativa. La antimicina A, que bloquea el flujo de electrones desde el citocromo *b* al citocromo c_1, específicamente desde el hemo b_L a Q, se une a Q_N, cercano al hemo b_H en el lado n (matriz) de la membrana. El mixotiazol, que impide el flujo de electrones desde QH_2 a la proteína ferro-sulfurada de Rieske, se une en Q_P, cercano al centro 2Fe-2S y al hemo b_L del lado p. La estructura dimérica es esencial para la función del Complejo III. La interfase entre monómeros forma dos cavernas, cada una con un sitio Q_P de un monómero y un sitio Q_N del otro. Los intermedios de la ubiquinona se mueven en el interior de estas cavernas protegidas.

El Complejo III cristaliza en dos conformaciones distintas (no mostradas). En una, el centro Fe-S de Rieske está cercano a su aceptor electrónico, el hemo del citocromo c_1, pero a relativa distancia del citocromo *b* y del sitio de unión de QH_2 en el que el centro Fe-S de Rieske recibe electrones. En la otra conformación, el centro Fe-S se ha desplazado del citocromo c_1 hacia el citocromo *b*. Se piensa que la proteína de Rieske oscila entre estas dos conformaciones al ser primero reducida y a continuación oxidada. [Fuente: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science* 281:64, 1998.]

electrónica; en su lugar podría servir para reducir la frecuencia con la que los electrones "se pierden" fuera del sistema, desplazándose del succinato al oxígeno molecular para producir las **especies reactivas de oxígeno (ROS)** peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el **radical superóxido** ($\cdot O_2^-$) descritas más adelante. Algunos individuos con mutaciones puntuales en subunidades del Complejo II próximas al hemo *b* o al sitio de unión de quinona sufren paraganglioma hereditario caracterizado por tumores benignos de la cabeza y cuello, normalmente en el cuerpo carotídeo, un órgano que mide los niveles de O_2 en la sangre. Estas mutaciones conducen a una mayor producción de ROS y quizás una mayor lesión tisular durante la oxidación del succinato. Las mutaciones que afectan la región de unión del succinato en el Complejo II pueden conducir a cambios degenerativos en el sistema nervioso central mientras que algunas mutaciones están asociadas con tumores de la corteza suprarrenal. ■

Complejo III: Ubiquinona a citocromo *c* Los electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol, QH_2) pasan a través de otros dos complejos proteicos más grandes de la membrana mitocondrial interna antes de alcanzar el último aceptor electrónico, O_2. El **Complejo III,** (también llamado **complejo citocromo bc_1** o **ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa**), acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH_2) al citocromo *c* con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembrana. La unidad funcional del Complejo III **(Fig. 19-10)** es un dímero. Cada monómero conta de tres proteínas importantes para la acción del complejo: citocromo *b*, citocromo c_1 y la proteína ferro-sulfurada de Rieske. (Otras proteínas asociadas con el Complejo III en vertebrados no se han conservado a lo largo de los fila y, presumiblemente, juegan papeles secundarios). Los ds monómeros del citocromo

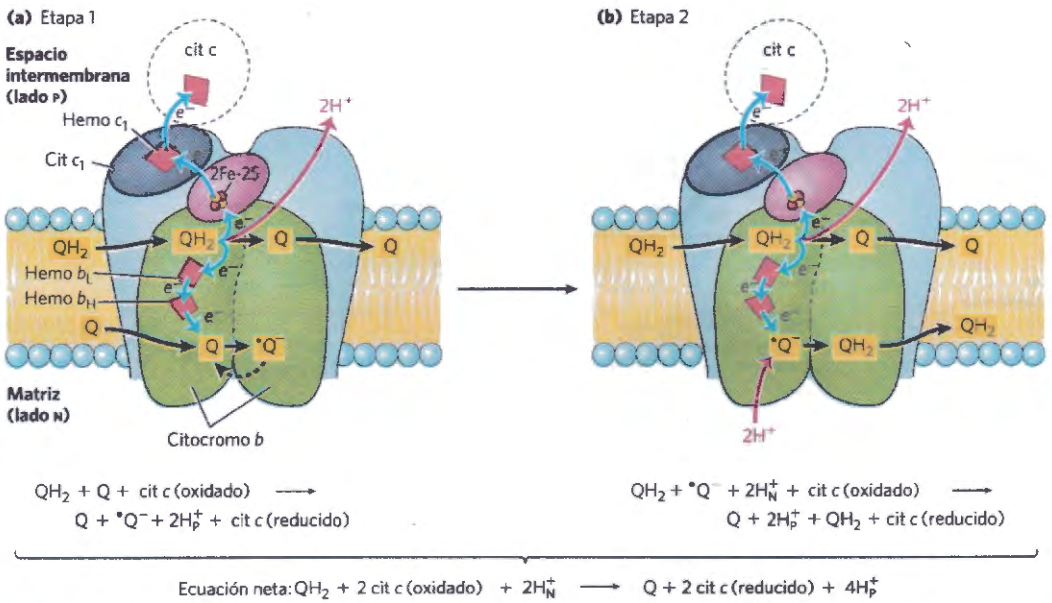


FIGURA 19-11 El ciclo Q, mostrado en dos etapas. La ruta de los electrones a través del Complejo III se muestra con flechas azules. El movimiento de varias formas de la ubiquinona se muestra con flechas negras. **(a)** En el primer paso, Q en el lado n, se reduce a radical semiquinona que vuelve a su posición anterior para aceptar otro electrón. **(b)** En el segundo paso, el radical semiquinona se convierte en QH_2. Mientras tanto, en el lado p de la membrana, se oxidan dos moléculas de QH_2 a Q liberando dos protones por molécula de Q (cuatro protones en total) en el espacio intermembrana. Cada QH_2 cede un electrón (vía centro Fe-S de Rieske) al citocromo c_1 y un electrón (vía citocromo *b*) a una molécula de Q cerca del lado n, reduciéndolo en dos pasos a QH_2. Esta reducción también utiliza dos protones por Q, tomados de la matriz (lado n). El cit c_1 reducido pasa electrones de uno en uno al cit *c*, que se disocia y transporta electrones al Complejo IV. En cada ciclo, una reducción de Q en el sitio Q_N está acoplada con dos oxidaciones de QH_2 en el sitio Q_P mediante el consumo de dos protones de la matriz y la liberación de cuatro protons al espacio intermembrana.

COPY-STATION

b rodean una caverna en el centro de la membrana, en la que la ubiquinona tiene libertad para moverse desde el lado de la matriz de la membrana (sitio Q_N en un monómero) al espacio intermembrana (sitio Q_P del otro monómero) a medida que lanza electrones y protones a través de la membrana mitocondrial interna.

Para explicar el papel de Q en la conservación de energía, Mitchell propuso el "ciclo Q" **(Fig. 19-11)**. A medida que los electrones se desplazan desde QH_2 a través del Complejo III, QH_2 se oxida con liberación de protones en un lado de la membrana (en Q_P), mientras que en el otro sitio (Q_N), Q se reduce y se captan protones. El producto de un sitio catalítico se convierte así en el sustrato del segundo sitio, y viceversa. La ecuación neta de las reacciones redox del ciclo Q es

$$QH_2 + 2\ cyt\ c_1\ (oxidado) + 2H_N^+ \longrightarrow Q + 2\ cyt\ c_1\ (reducido) + 4H_P^+ \qquad (19\text{-}3)$$

El ciclo Q adapta el cambio entre el transportador de dos electrones ubiquinol (la forma reducida de la ubiquinona) y los transportadores de un electrón, los hemos b_L y b_H del citocromo b y los citocromos c_1 y *c*, y resulta en la captación de dos protones en el lado n y la liberación de cuatro protones en el lado p por cada par de electrones que pasan del Complejo III al citocromo *c*. Dos de los protones liberados en el lado p son electrogénicos; los otros dos son electroneutros, equilibrados por las dos cargas (electrones) pasadas al citocromo *c* en el lado p. Aunque la vía de los electrones a través de este segmento de la cadena respiratoria es complicada, el efecto neto de la transferencia es simple: QH_2 se oxida a Q al tiempo que se reducen dos moléculas de citocromo *c* y se desplazan dos protones del lado p al lado n de la membrana mitocondrial interna.

El citocromo *c* es una proteína soluble del espacio intermembrana, que se asocia reversiblemente con el lado p de la membrana interna. Después de que su único hemo acepte un electrón del Complejo III, el citocromo *c* se desplaza en el espacio intermembrana hacia el Complejo IV para ceder el electrón a un centro de cobre binuclear.

Complejo IV: Citocromo c a O_2 En el último paso de la cadena respiratoria, el **Complejo IV**, también llamado. **citocromo oxidasa**, transporta electrones desde el citocromo *c* al oxígeno molecular, reduciéndolo a H_2O. El Complejo IV es un enzima dimérico muy grande (cada monómero tiene 13 subunidades y una M_r de 204.000) de la membrana mitocondrial interna. Las bacterias contienen una forma mucho más sencilla con sólo 3 o 4 subunidades por monómero, pero que sigue siendo capaz de catalizar tanto la transferencia de electrones como el bombeo de protones. La comparación de los complejos mitocondrial y bacteriano sugiere que estas 3 subunidades se han conservado durante la evolución; en organismos multicelulares, las otras 10 subunidades pueden contribuir a ls formación o estabilidad del Complejo IV **(Fig. 19-12)**.

La subunidad II del Complejo IV contiene dos iones Cu que forman complejo con los grupos –SH de dos residuos Cys en un centro binuclear (Cu_A; Fig. 19-12b) que se parece a los centros 2Fe-2S de las proteínas ferro-sulfuradas. La subunidad I contiene dos grupos

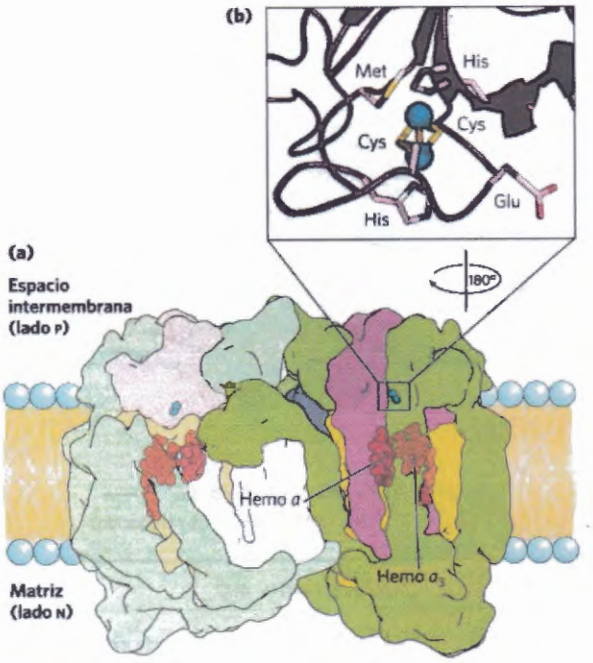


FIGURA 19-12 Estructura de la citocromo oxidasa (Complejo IV). (a) Este complejo (bovino) tiene 13 subunidades en cada monómero idéntico de su estructura dimérica., pero aquí sólo se muestran cuatro proteínas núcleo. La subunidad I (en amarillo) tiene dos grupos hemo, *a* y a_3 cerca de un único ión cobre, Cu_B (no visible). El hemo a_3 y Cu_B forman un centro Fe-Cu binuclear. La subunidad II (púrpura) contiene dos iones Cu formando complejo con los grupos -SH de dos residuos Cys en un centro binuclear, Cu_A, que se parece a los centros 2Fe-2S de las proteínas ferro-sulfuradas. Este centro binuclear y el sitio de unión del citocromo *c* se localizan en un dominio de la subunidad II que sobresale desde el lado P de la membrana interna (hacia el espacio intermembrana). La subunidad III (en azul claro) es esencial para el movimiento rápido de protones a través de la subunidad II. El papel de las otras 10 subunidades del Complejo IV de mamíferos (en verde) no se conoce aún aunque algunas funcionan en la formación o estabilización del complejo. **(b)** El centro binuclear de Cu_A. Los iones Cu (esferas azules) comparten electrones de forma equitativa. Cuando el centro está reducido los iones tienen las cargas formales $Cu^{1+}Cu^{1+}$; en la forma oxidada, $Cu^{1.5+}Cu^{1.5+}$. Seis residuos aminoácidos son ligandos alrededor de los iones Cu: , Glu, Met dos His y dos Cys. [Fuente: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science*, 272:1136, 1996.]

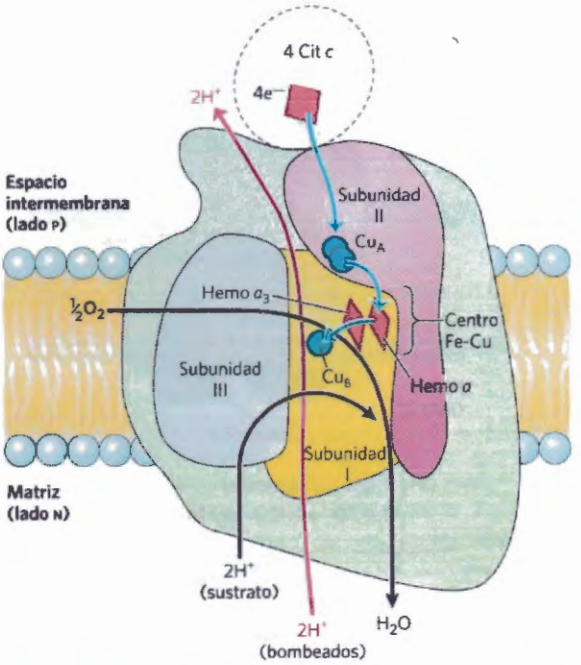


FIGURA 19-13 Paso de los electrones a través del Complejo IV. Por razones de simplicidad solo se muestra un monómero del Complejo IV dimérico bovino. Las subunidades I, II y III son tres proteínas esenciales en el flujo electrónico. La estructura verde mayor incluye las 10 proteínas restantes de cada monómero del complejo dimérico. La transferencia electrónica a través del Complejo IV comienza con el citocromo *c* (parte superior). Dos moléculas de citocromo *c* reducidas donan un electrón cada una al centro binuclear Cu_A. A partir de aquí los electrones pasan a través del hemo *a* al centro Fe-Cu (citocromo a_3 y Cu_B). El oxígeno se une ahora al hemo a_3 y se reduce a su forma peroxi (O_2^{2-}; no mostrada aquí) gracias a dos electrones del centro Fe-Cu. La aportación de dos electrones adicionales del citocromo *c* (arriba,) por un total cuatro electrones convierte el O_2^{2-} en dos moléculas de agua, consumiendo cuatro protones "sustrato" de la matriz. Simultáneamente, se bombean dos protones desde la matriz por cada par de electrones que pasan a través del Complejo IV, por un mecanismo todavía desconocido. Obsérvese que la reducción de O_2 a $2H_2O$ requiere cuatro electrones, o dos pares de electrones.

Copy Station

hemo, designados *a* y a_3, y otro ión cobre (Cu_B). El hemo a_3 y el Cu_B forman un segundo centro binuclear que acepta los electrones del hemo *a* y los transfiere al O_2 unido al hemo a_3. El papel detallado de la subunidad III no está claro, pero su presencia es esencial para el funcionamiento del Complejo III.

La transferencia de electrones a través del complejo IV va del citocromo *c* al centro Cu_A, al hemo *a*, al centro hemo a_3-Cu_B, y finalmente al O_2 **(Fig. 19-13)**. Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, el enzima consume dos H^+ "sustrato" de la matriz (lado n) convirtiendo el $\frac{1}{2}O_2$ en H_2O. También utiliza la energía de esta reacción redox para bombear dos protones hacia el espacio intermembrana (lado p) por cada par de electrones que pasan, añadiéndose al potencial electroquímico producido por el transporte de protones impulsado por el potencial redox a través del los Complejos I y III. La reacción global catalizada por el complejo IV es:

$$2 \text{ cyt } c \text{ (reducido)} + 4H^+_N + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow 2 \text{ cyt } c \text{ (oxidado)} + 2H^+_P + H_2O \qquad (19\text{-}4)$$

Esta reducción de $\frac{1}{2}O_2$ por dos electrones requiere la oxidación de QH_2, la cual, a su vez, requiere la oxidación de NADH a succinato. En el Complejo IV, el O_2 se reduce en centros redox que transportan solo un electrón a la vez. Normalmente los intermediarios oxigenados incompletamente reducidos permanecen fuertemente unidos al complejo hasta que se han convertido completamente en agua, si bien se escapa una pequeña fracción de intermediarios del oxígeno. Estos intermediarios son especies de oxígeno reactivo que pueden dañar los componentes celulares a menos que se eliminen por medio de mecanismos de defensa descritos más adelante.

Los complejos mitocondriales se pueden asociar formando respirasomas

Aunque los cuatro complejos transferidores de electrones pueden separarse en el laboratorio, en la mitocondria intacta, los complejos respiratorios se asocian fuertemente entre sí en la membrana interna formando **respirasomas**, combinaciones funcionales de dos o más complejos diferentes de transferencia electrónica. Por ejemplo, cuando se extrae suavemente el Complejo III de las membranas mitocondriales, se encuentra asociado con el Complejo I y permanece asociado durante la electroforesis suave. También pueden aislarse gregados purificados de los Complejos III y IV y cuando se observan utilizando la potente técnica de ls croipmicropscopia electrónica, aparecen como supercomplejos del tamaño y contorno adecuados para acomodar las estructuras cristalinas conocidas de ambos **(Fig. 19-14)**. La cinética del flujo electrónico a través de la serie de complejos respiratorios sería muy diferente en los dos casos extremos de asociación muy fuerte y de no asociación entre ellos: (1) si los complejos estuviesen fuertemente unidos, las transferencias electrónicas tendrían lugar esencialmente a través de un estado sólido, y (2) si los complejos funcionasen separadamente, los electrones serían transportados entre ellos por la ubiquinona y el citocromo *c*. Las pruebas cinéticas apoyan la transferencia a través de un estado sólido y, por consiguiente, el modelo del respirasoma.

La cardiolipina, el lípido que es especialmente abundante en la membrana mitocondrial interna (véanse las Figs. 10-8 y 11-2) puede ser de importancia crítica para la integridad de los respirasomas; su eliminación con detergentes o su ausencia en ciertos mutantes de levaduras da lugar a una transferencia de electrones mitocondrial defectuosa y a una pérdida de afinidad entre los complejos respiratorios. Algunas de las proteínas "auxiliares" de los complejos, sin un papel claro en la transferencia de electrones, pueden servir para mantener unidos los respirasomas.

Otras rutas ceden electrones a la cadena respiratoria a través de la ubiquinona

Otras reacciones de transferencia de electrones pueden reducir la ubiquinona de la membrana mitocondrial interna **(Fig. 19-15)**. En el primer paso de la β-oxidación de los acil-CoA grasos, catalizada por la flavoproteína **acil-CoA deshidrogenasa** (véase la Fig. 17-8), los electrones pasan desde el sustrato al FAD de la deshidrogenasa y, a continuación, a la flavoproteína transferidora de electrones (ETF). La ETF pasa sus electrones a la **ETF: ubiquinona oxidorreductasa**, la cual reduce Q de la membrana mitocondrial interna a QH_2. El glicerol 3-fosfato, formado ya sea por degradación de triacilgliceroles o por reducción de la dihidroxiacetona fosfato de la glucólisis, es oxidado por la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** (véase la Fig. 17-4), una flavoproteína localizada en la parte exterior de la membrana mitocondrial interna. El

COPY-STATION

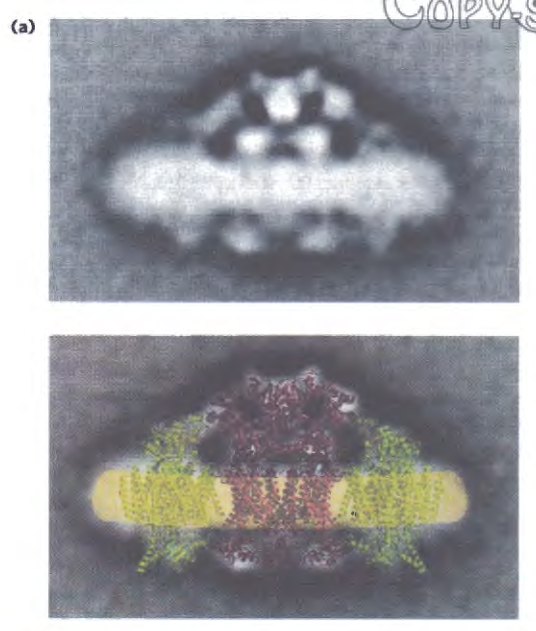


FIGURA 19-14 Un respirasoma compuesto por los Complejos III y IV. **(a)** Supercomplejos purificados que contienen los Complejos III y IV (de levadura) visualizados mediante microscopia electrónica después de una cpongelación rápida. Se promediaron las densidades electrónicas de centenares de imágenes para obtener esta vista compuesta (véase el Recuadro 19-1). **(b)** Las estructuras por rayos X de un Complejo III (rojo; de levadura) y dos Complejos IV (verde; de corazón bovino) pudieron ajustarse al mapa de densidad electrónica sugiriendo una manera posible de interacción de estos complejos en un respirasoma. Esta vista se encuentra en el plano de la bicapa (amarilloFuente: Cortesía de Egbert Boekema.]

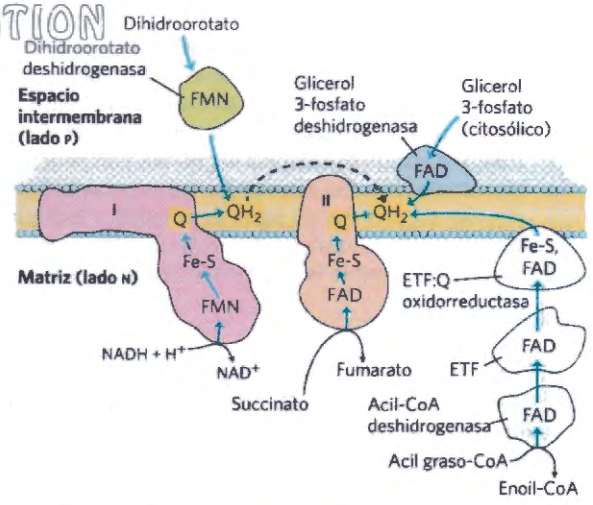


FIGURA 19-15 Rutas de transferencia electrónica a la ubiquinona en la cadena respiratoria. Los electrones del NADH de la matriz pasan a través del FMN de una flavoproteína (NADH deshidrogenasa) a una serie de centros Fe-S (en el Complejo I) y, seguidamente, a Q. Los electrones de la oxidación del succinato en el ciclo del ácido cítrico pasan a través de una flavoproteína, con varios centros Fe-S (Complejo II) en su camino hacia Q. La acil-CoA deshidrogenasa, primer enzima de la β-oxidaxción de los ácidos grasos, transfiere electrones a la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), desde la que pasan a Q vía la ETF-ubiquinona oxidorreductasa. El dihidroorotato, un intermediario en la ruta de síntesis de nucleótidos pirimidínicos (véase la Fig. 22-38), dona dos electrones a Q a través de una flavoproteína (dihidroorotato deshidrogenasa). Y el glicerol 3-fosfato, un intermediario de la glucólisis en el citosol, cede electrones a una flavoproteína (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) en la cara exterior de la membrana mitocondrial interna, desde la que pasan a Q.

RECUADRO 19-1 MÉTODOS Determinación de estructuras tridimensionales de grandes complejos macromoleculares por criomiscroscopia electrónica de partícula única

Para nuestra comprensión de un proceso muy complejo tal como la fosforilación oxidativa mitocondrial es de gran ayuda el conocimiento de las estructuras moleculares detalladas de las proteínas que participan en el proceso. No obstante, a veces es difícil determinar la estructura molecular de grandes complejos macromoleculares tales como los complejos de la cadena respiratoria o la ATP sintasa. Las proteínas integrales de membrana a menudo se resisten a la cristalización una vez se han extraido de su entorno lipídico, de modo que sus estructuras no pueden resolverse mediante difracción de rayos x. En principio, objetos discretos del orden de 100 a 300 Å de diámetro pueden visualizarse mediante microscopia electrónica (ME). En la práctica, la elevada intensidad del haz de ME a menudo daña el objeto antes de que pueda obtenerse una imagen de alta resolución. En la **criomicrosopia electrónica**, una muestra que contiene muchas copias individuales de la estructura de interés se congelan rápidamente y se mantienen congeladas mientras se observan en dos dimensiones con el microsopio electrónico, lo que reduce grandemente el daño de la muestra por el haz de electrones. El desarrollo del detector directo de electrones, con mayor sensibilidad y menos ruido, fue también una mejora clave, lo que permitió exposiciones más cortas de la muestra al haz de electrones.

Partículas tales como los complejos mitocondriales purificados, dispuestos al azar en la rejilla del microscopio se visualizan con el criomicroscopio electrónico. Cuando se combina la crio-ME con poderosos algoritmos para transformar las estructuras bidimensionales de decenas de miles de complejos individuales orientados al azar en un compuesto tridimensional, es, a veces, posible la determinación de la estructura molecular a un nivel comparable al obtenido por la cristalografía de rayos x (Fig. 1). En casos favorables,

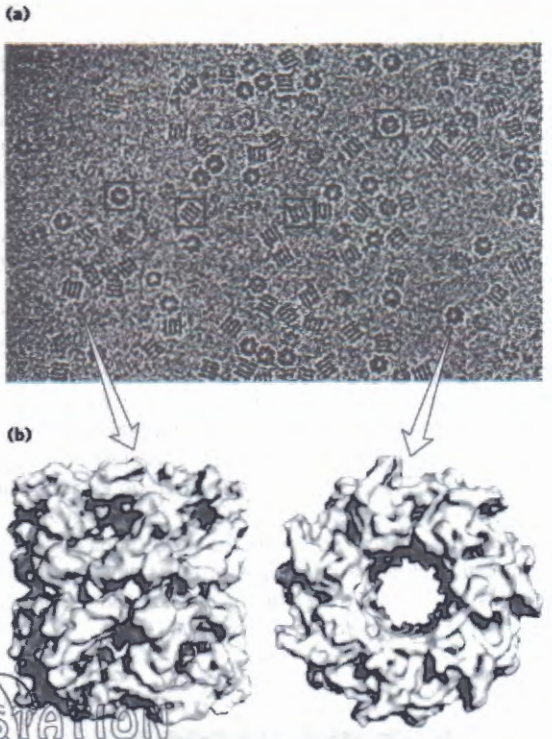


FIGURA 1 Estructura de la proteína chaperona GroEL tal como se determina por crio-ME de una sola partícula. **(a)** Imágenes ME de muchas partículas individuales de GroEL. **(b)** Vistas lateral y superior de la estructura tridimensional proveniente del análisis de las imágenes de ME. [Fuentes: (a) © Alberto Bartesaghi, PhD. (b) PDB ID 3E76, P. D. Kaiser et al., *Acta Crystallogr.* 65:967, 2009].

aceptor electrónico en esta reacción es Q; el QH_2 producido entra en el fondo de QH_2 de la membrana. El importante papel de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa en lanzar equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a la matriz mitocondrial se describe en la Sección 19.2 (véase la Fig. 19-32). La **dihidroorotato deshidrogenasa**, que actúa en la síntesis de pirimidinas (véase la Fig. 22-38), también se encuentra en el exterior de la membrana mitocondrial interna y cede electrones a Q en la cadena respiratoria. El QH_2 reducido pasa sus electrones a través del Complejo III y, finalmente, al O_2.

La energía de la transferencia de electrones se conserva eficientemente en un gradiente de protones

La transferencia de dos electrones desde el NADH a través de la cadena respiratoria al oxígeno molecular se puede escribir:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \qquad (19\text{-}5)$$

Esta reacción neta es muy exergónica. Para el par redox $NAD^+/NADH$, E'° es -0,320 V, mientras que para el par O_2/H_2O, E'° es 0,816 V. El $\Delta E'^\circ$ de esta reacción es, por tanto, 1,14 V siendo la variación de energía libre estándar (véase la Ec. 13-7; p. 521)

$$\begin{aligned}\Delta G'^\circ &= -nF\,\Delta E'^\circ \qquad (19\text{-}6)\\ &= -2(96{,}5\ \text{kJ/V·mol})(1{,}14\ \text{V})\\ &= -220\ \text{kJ/mol (de NADH)}\end{aligned}$$

Esta variación de energía libre *estándar* se basa en la suposición de que las concentraciones de NADH y NAD^+ son iguales (1 m). En las mitocondrias que respiran activamente, la acción de muchas deshidrogenasas mantiene el cociente [NADH]/[NAD^+] real muy por encima de la unidad, por lo que la variación real en la energía libre mostrado en la Ecuación 19-5 es sustancialmente mayor (más negativo) que –220 kJ/mol. Un cálculo similar para la oxidación del succinato muestra que la transferencia de electrones desde el succinato (E'°

se pueden automatizar los aspectos repetitivos, tales como la elección de los objetos a incluir en el análisis, la obtención de la imagen individual de cada objeto y cálculos que dan lugar a una estructura tridimensional a partir del gran número de imágenes bidimensionales. Si se conocen las estructuras de los componentes proteicos individuales de un gran complejo por cristalografía de rayos x (véase la Fig. 19-25), se pueden encajar los modelos atómicos en los contornos del complejo para confirmar la estructura obtenida por crio-ME (Fig. 2). El EMDataBank (emdatabank.org) es una fuente unificada para acceder a los mapas de estructura ME depositados en bancos de datos y a los que se les asignan códigos de acceso EMD.

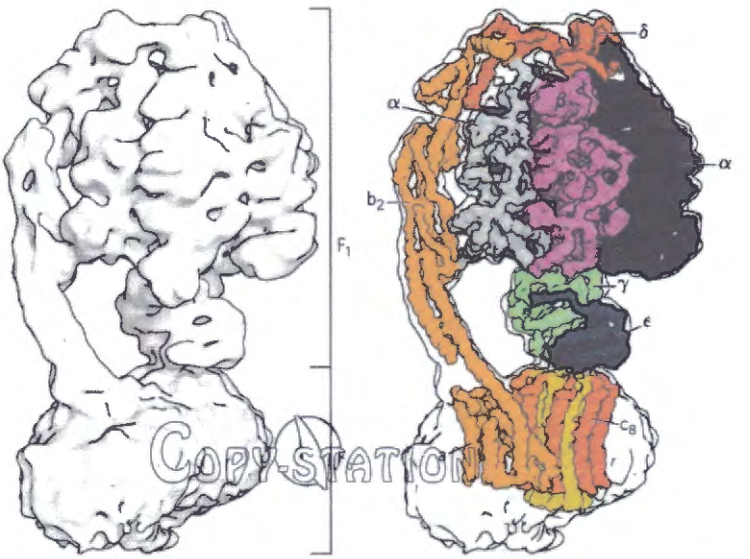


FIGURA 2 **(a)** Estructura tridimensional de la ATP sintasa bovina obtenida por crio-ME de una sola partícula. Este método proporcionó más información de la estructura de las subunidades a y b en la porción del complejo incrustada en la membrana que la que era disponible por cristalografía de rayos x. La estructura de la parte inferior izquierda incluye la subunidad a y una extensión de la b, al igual que varias proteínas pequeñas asociadas con la estructura F_o pero que no es visible en las estructuras cristalográficas. **(b)** Un modelo atómico consistente con las estructuras cristalinas de rayos x puede encajarse con el contorno deducido por crio-ME lo que properciona una imagen muy mejorada del conjunto de la estructura de la ATP sintasa. [Fuentes: (a) EMD-3164 y (b) PDB IS 5ARA, A. Zhou et al., *eLife* 4:e10180, 2015.]

para el fumarato/succinato = 0,031 V) al O_2 tiene una variación de energía libre estándar menor, aunque aún negativa, de unos -150 kJ/mol.

Gran parte de esta energía se usa para bombear protones fuera de la matriz. Por cada par de electrones transferidos al O_2 se bombean afuera cuatro protones por el Complejo I, cuatro por el Complejo III y dos por el Complejo IV **(Fig. 19-16)**. Por lo tanto, la ecuación *vectorial* del proceso es

$$NADH + 11H_N^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + 10H_P^+ + H_2O \qquad (19\text{-}7)$$

La energía electroquímica inherente en esta diferencia de concentración de protones y en la separación de cargas, representa una conservación temporal de gran parte de la energía de la transferencia electrónica. La energía almacenada en este tipo de gradiente, denominada **fuerza protón-motriz**, tiene dos componentes: (1) la *energía química potencial* debida a la diferencia en concentración de una especie química (H^+) entre las dos regiones separadas por la membrana, y (2) la *energía eléctrica potencial* que se origina con la separación de cargas cuando un protón cruza la membrana sin un contraión **(Fig. 19-17)**.

Tal como se mostró en el Capítulo 11, la variación en energía libre para la generación de un gradiente electroquímico por una bomba iónica es

$$\Delta G = RT \ln(C_2/C_1) + ZF\,\Delta\psi \qquad (19\text{-}8)$$

donde C_2 y C_1 son las concentraciones de un ión en dos regiones siendo $C_2 > C_1$; Z es el valor absoluto de su carga eléctrica (1 para un protón) y $\Delta\psi$ es la diferencia en potencial eléctrico transmembrana, medido en voltios.

Para protones,

$$\ln(C_2/C_1) = 2{,}3(\log[H^+]_P - \log[H^+]_N) = 2{,}3(pH_N - pH_P) = 2.3\ \Delta pH$$

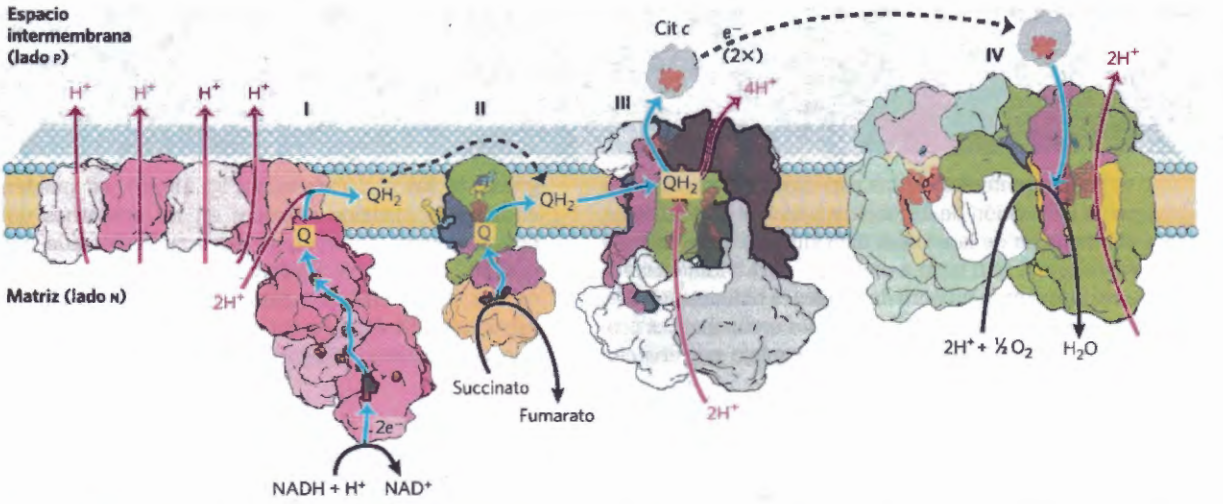


FIGURA 19-16 Resumen del flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria. Los electrones llegan a Q vía Complejos I y II (así como a través de otras vías mostradas en la Fig. 19-15). Q reducido (QH_2) actúa de transportador móvil de electrones y protones. Pasa electrones al Complejo III, el cual los pasa a otro eslabón de conexión móvil, el citocromo *c*. A continuación el Complejo IV transfiere electrones desde el citocromo *c* reducido al O_2. El flujo electrónico a través de los Complejos I, III y IV va acompañado del flujo de protones desde la matriz al espacio intermembrana. En el corazón bovino las proporciones aproximadas de los Complejos I:II:III:IV son 1,1:1,3:3,0:6,7. Las líneas a trazos indican la difusión de Q en el plano de la membrana interna y del citocromo *c* a través del espacio intermembrana. [Fuentes: Complejo I, PDB ID 4HEA, A. R. Baradaran et al., *Nature* 494:443, 2013. Complejo II: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell* 121:1043, 2005. Complejo III: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science*, 281:64, 1998. Citocromo *c*: PDB ID 1HRC, G. W. Bushnell et al., *J. Mol. Biol.* 214:585, 1990. Complejo IV: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science*, 272:1136, 1996.]

y la Ecuación 19-8 se reduce a

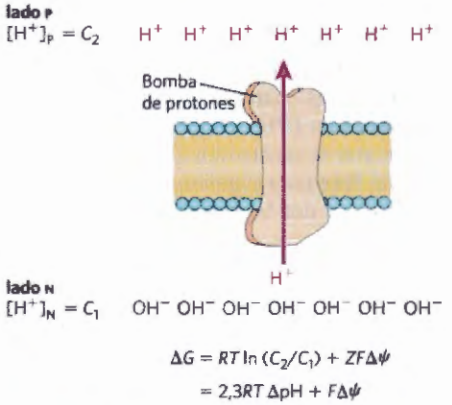
$$\Delta G = 2.3RT\,\Delta\text{pH} + F\Delta\psi \qquad (19\text{-}9)$$

En las mitocondrias que respiran activamente, la $\Delta\psi$ medida es de 0,15 a 0,20 V y el pH de la matriz es unas 0,75 unidades más alcalino que el del espacio intermembrana.

EJEMPLO PRÁCTICO 19-1 Energética de la transferencia electrónica

Calcule la cantidad de energía conservada en el gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna por par de electrones transferidos a través de la cadena respiratoria desde el NADH al oxígeno. Suponga que $\Delta\psi$ es 0,15 V y la diferencia de pH es 0,75 unidades a la temperatura corporal de 37 °C.

Solución: La Ecuación 19-9 da la variación de energía libre estándar cuando se transporta *un* mol de protones a través de la membrana interna. Sustituyendo los valores de las constantes R y F, 310 K para T y los valores medidos para ΔpH (0,75 unidades) y $\Delta\psi$ (0,15 V) en esta ecuación da ΔG = 19 kJ/mol (de protones). Debido a que la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el O_2 va acompañada del bombeo hacia afuera de 10 protones (Ec. 19-7), se conservan en el gradiente protónico unos 190 kJ (de los 220 kJ liberados en la oxidación de 1 mol de NADH).



$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi$$
$$= 2{,}3RT\,\Delta\text{pH} + F\Delta\psi$$

FIGURA 19-17 Fuerza protón-motriz. La membrana mitocondrial interna separa dos compartimientos de diferente $[H^+]$, produciendo diferencias en la concentración química (ΔpH) y en la distribución de carga (Δ^+) a través de la membrana. El efecto neto es la fuerza protón-motriz (ΔG) que se puede calcular en la forma indicada aquí. Todo ello se explica de manera más detallada en el texto.

Cuando los protones fluyen espontáneamente *a favor* de su gradiente electroquímico, hay energía disponible para producir trabajo. En mitocondrias, cloroplastos y bacterias aeróbicas la energía electroquímica en el gradiente protónico impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. En la Sección 19.2 volveremos a la energética y estequiometría de la síntesis de ATP impulsada por el potencial electroquímico del gradiente protónico.

Durante la fosforilación oxidativa se producen especies de oxígeno reactivas

Diversos pasos en la ruta de reducción del oxígeno en la mitocondria tienen el potencial para producir radicales libres muy reactivos que pueden dañar las células. En el paso de electrones desde QH_2 al Complejo III y en el paso de electrones desde los Complejos I y II a QH_2, interviene el radical $^{\cdot}Q^-$ como intermedio. El $^{\cdot}Q^-$ puede,

con una probabilidad baja, pasar un electrón al O_2 en la reacción

$$O_2 + e^- \longrightarrow {}^{\bullet}O_2^-$$

El radical superóxido libre así generado es muy reactivo; su formación también conduce a la producción del radical hidroxilo libre, $^{\bullet}OH$, aún más reactivo **(Fig. 19-18)**.

Las especies de oxígeno reactivas pueden causar estragos reaccionando con enzimas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos dañándolos. En mitocondrias que respiran activamente desde un 0,1 que reducen la velocidad del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria aumentan la formación de superóxido, quizás porque prolongan el tiempo de vida del $^{\bullet}O_2^-$ generado en el ciclo Q. La formación de ROS está favorecida cuando se dan dos circunstancias: (1) las mitocondrias no están sintetizando ATP (por falta de ADP 0y O_2) y, por tanto, tienen una elevada fuerza protón-motriz y una razón QH_2/Q alta y (2) hay una razón NADH/NAD^+ elevada en la matriz. En estas situaciones la mitocondria está bajo estrés oxidativo (hay más electrones disponibles para entrar en la cadena respiratoria de los que pueden pasar inmediatamente al oxígeno). Cuando el suminstro de dadores electrónicos (NADH) se corresponde con el de aceptores electrónicos, hay menos estrés oxidativo, y se reduce mucho la producción de ROS. Aunque la producción en exceso de ROS es claramente perjudicial, concentraciones *bajas* de ROS pueden ser utilizadas por la célula como señal que refleja un suministro insuficiente de oxígeno (hipoxia) para poner en marcha ajustes metabólicos (véase la Fig. 19-34)

Para impedir el daño oxidativo por $^{\bullet}O_2^-$, las células tienen el enzima **superóxido dismutasa,** que cataliza la reacción

$$2\ {}^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así generado se vuelve inocuo por acción de la **glutatión peroxidasa** (Fig. 19-18). La glutatión reductasa recicla el glutatión oxidado a su forma reducida, utilizando electrones del NADPH formado por la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (en la mitocondria) o por la vía de las pentosas fosfato (en el citosol; véase la Fig. 14-21). El glutatión reducido también sirve para mantener los grupos sulfhidrilo de la proteína en su estado reducido, impidiendo algunos de los efectos deletéreos del estrés oxidativo.

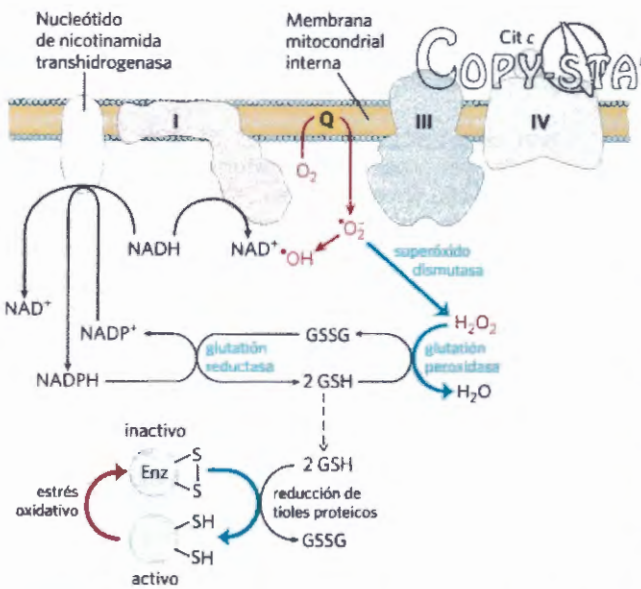


FIGURA 19-18 Formación de ROS en mitocondrias y defensas mitocondriales. Cuando la velocidad de entrada de electrones en la cadena respiratoria y la velocidad de transferencia de electrones a través de la cadena no está ajustadas aumenta la formación de radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) en los Complejos I y III, a medida que el radical ubiquinona parcialmente reducido ($^{\bullet}Q^-$) cede un electrón al O_2. El superóxido actúa sobre la aconitasa, una proteína 4Fe-4S (no mostrada), liberando Fe^{2+}. En presencia de Fe^{2+}, la reacción de Fenton conduce a la formación del radical hidroxilo libre ($^{\bullet}OH$) muy reactivo. Las reacciones mostradas en azul defienden la célula frente a los efectos lesivos del superóxido. El glutatión reducido (GSH; véase la Fig. 22-29) cede electrones para la reducción del H_2O_2 y de residuos Cys oxidados (-S-S-) en enzimas y otras proteínas y el GSH se regenera a partir de la forma oxidada (GSSG) por reducción con NADPH.

Las mitocondrias de plantas tienen mecanismos alternativos para oxidar el NADH

Las mitocondrias de plantas proporcionan ATP a la célula durante periodos de poca iluminación o en la oscuridad, mediante mecanismos completamente análogos a los utilizados por los organismos no fotosintéticos. En presencia de luz, la fuente principal de NADH mitocondrial es una reacción en la que la glicina generada en un proceso denominado fotorrespiración se convierte en serina (véase la Fig. 20-48):

$$2\ \text{glicina} + NAD^+ \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Debido a las razones que se discuten en el Capítulo 20, las plantas han de realizar esta reacción incluso cuando no necesitan NADH para producir ATP. Para regenerar NAD^+ a partir del NADH que no se necesita, las mitocondrias de plantas (y de algunos hongos y protistas) transfieren electrones directamente del NADH a la ubiquinona, y de la ubiquinona directamente al O_2, sin pasar por los Complejos III y IV y sus bombas protónicas. En este proceso se disipa en forma de calor la energía que contenía el NADH, lo cual en algunos casos es útil para la planta (Recuadro 19-2). La oxidación del NADH *resistente al cianuro* es, por lo tanto, la característica principal de esta vía de transferencia electrónica única en plantas; a diferencia de la citocromo oxidasa (Complejo IV), la QH_2 oxidasa alternativa no es inhibida por el cianuro.

RESUMEN 19.1 La cadena respiratoria mitocondrial

■ La teoría quimiosmótica proporciona el marco intelectual para comprender muchas transducciones biológicas de energía entre ellas la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. La energía del flujo de electrones se conserva mediante el bombeo concomitante de protones a través de la membrana, lo que produce un gradiente electroquímico, la fuerza protón-motriz.

RECUADRO 19-2 Calor, plantas malolientes y rutas respiratorias alternativas

Muchas plantas con flores atraen insectos polinizadores liberando moléculas olorosas que mimetizan las fuentes de alimentación naturales de los insectos o los sitios potenciales para la puesta de los huevos. Las plantas polinizadas por moscas o escarabajos, que normalmente se alimentan o hacen la puesta de los huevos en estiércol o en carroña, utilizan, a veces, compuestos malolientes para atraerlos.

Una de las familias de plantas malolientes es la de las Aráceas, que incluye filodendros, un tipo de lirios y las coles mofeta. Estas plantas tienen flores pequeñas agrupadas densamente en una estructura erecta (espádice) y están rodeadas por una hoja modificada (espata). Aquélla libera olor a carne podrida o estiércol. Antes de la polinización la espádice se calienta, en algunas especies hasta 20-40 °C por encima de la temperatura ambiente. La producción de calor (termogénesis) ayuda a evaporar las moléculas olorosas para que se dispersen mejor, y debido a que tanto la carne podrida como el estiércol están generalmente calientes como consecuencia del metabolismo hiperactivo de los microorganismos carroñeros, el calor por sí mismo también podría atraer a los insectos. En el caso de la col mofeta oriental (Fig. 1), que florece al final del invierno o al principio de la primavera cuando la nieve todavía cubre el suelo, la termogénesis permite que la espádice crezca a través de la nieve.



FIGURA 1 Col mofeta oriental

¿Cómo calienta una col mofeta oriental su espádice? Aunque las mitocondrias de plantas, hongos y eucariotas unicelulares tienen cadenas respiratorias que son básicamente los mismos que los de animales, también tienen una vía respiratoria alternativa. Una QH_2 oxidasa resistente al cianuro transfiere directamente los electrones desde la reserva de ubiquinona al oxígeno, evitando los dos pasos de translocación de protones de los Complejos III y IV (Fig. 2). La energía que se podría haber conservado en forma de ATP se

COPY-STATION

- En la mitocondria, iones hidruro eliminados de sus sustratos (tales como el α–cetoglutarato y el malato) por la acción de deshidrogenasas ligadas al NAD ceden sus electrones a la cadena respiratoria que los transfiere al O_2 molecular reduciéndolo a H_2O.
- Los equivalentes de reducción del NADH pasan a través de una serie de centros Fe-S a la ubiquinona que transfiere los electrones al citocromo *b*, primer transportador del Complejo III. En este complejo los electrones pasan por dos caminos diferentes a través de dos citocromos de tipo *b* y el citocromo c_1 a un centro Fe-S. El centro Fe-S pasa electrones, de uno en uno, a través del citocromo *c*, al Complejo IV, la citocromo oxidasa. Este enzima que contiene cobre y que también contiene citocromos a y a_3, acumula electrones pasándolos al O_2 que se reduce a H_2O.
- Algunos electrones entran en esta cadena de transportadores por rutas alternativas. El succinato es oxidado por la succinato deshidrogenasa (Complejo II) que contiene una flavoproteína que pasa los electrones a través de varios centros Fe-S a la ubiquinona. Los electrones procedentes de la oxidación de ácidos grasos pasan a la ubiquinona vía la flavoproteína transferidora de electrones. La oxidación del glicerol fosfato y del dihidroorotato también envía electrones a la cadena respiratoria a nivel de QH_2.
- Las especies de oxígeno reactivas, que son potencialmente dañinas, producidas en la mitocondria se inactivan por un conjunto de enzimas protectores entre los que se cuentan la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Niveles bajos de ROS actúan como señales para coordinar la fosforilación oxidativa mitocondrial con otras rutas metabólicas.
- Las plantas, hongos y eucariotas unicelulares tienen, además de la ruta típica de transferencia electrónica acoplada a la síntesis de ATP, una ruta alternativa que recicla el exceso de NADH a NAD^+.

19.2 Síntesis de ATP

¿Cómo se transforma un gradiente de concentración de protones en ATP? Hemos visto que la transferencia electrónica libera, y la fuerza protón-motriz conserva, energía más que suficiente (unos 190 kJ) por "mol" de par de electrones para impulsar la formación de un mol de ATP, que requiere unos 50 kJ. La fosforilación oxidativa mitocondrial no plantea, por tanto, ningún problema termodinámico. Pero, ¿qué mecanismo químico acopla el flujo de protones con la fosforilación?

En el modelo quimiosmótico, la oxidación y la fosforilación están obligatoriamente acoplados

El **modelo quimiosmótico** propuesto por Peter Mitchell es el paradigma del acoplamiento energético. Según el modelo **(Fig. 19-19)**, la energía electroquímica inherente a la diferencia en la concentración de protones y a la separación de cargas a través de la membrana mitocondrial interna, la fuerza protón-motriz, impulsa la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de manera pasiva de vuelta hacia la matriz a través de

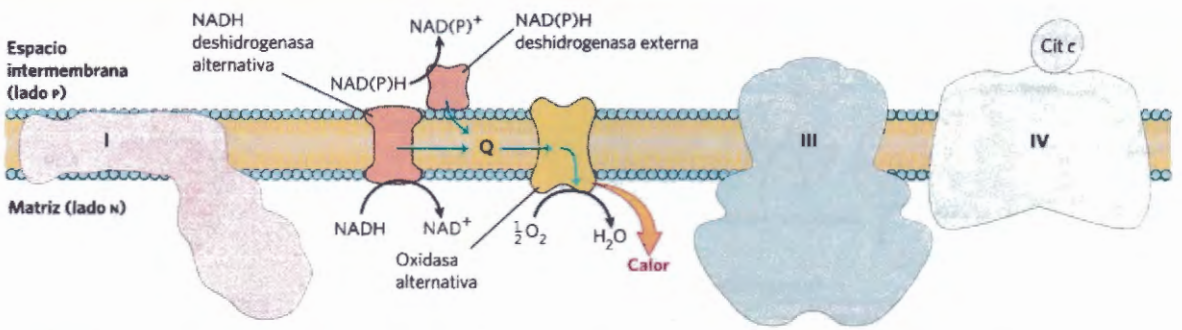


FIGURA 2 Transportadores de electrones de la membrana interna de las mitocondrias de plantas. Los electrones pueden fluir a través de los Complejos I, III y IV, al igual que en las mitocondrias de animales, o a través de transportadores alternativos específicos de plantas mediante las vías mostradas con flechas azules.

libera, en cambio, en forma de calor. Las mitocondrias de plantas también tienen una NADH deshidrogenasa alternativa, insensible a la rotenona, inhibidor del Complejo I (véase la Tabla 19-4), que transfiere electrones desde el NADH de la matriz directamente a la ubiquinona, sin utilizar el Complejo I ni el bombeo protónico asociado. Las mitocondrias de plantas tienen además otra NADH deshidrogenasa, en la cara externa de la membrana interna, que transfiere electrones desde el NADPH o NADH del espacio intermembrana a la ubiquinona, igualmente sin utilizar el Complejo I. De este modo, cuando los electrones pasan por la vía respiratoria alternativa gracias a la NADH deshidrogenasa insensible a la rotenona, a la NADH deshidrogenasa externa, o a la succinato deshidrogenasa (Complejo II) y pasan al O_2 vía la oxidasa alternativa resistente al cianuro, la energía no se conserva como ATP, sino que se libera en forma de calor. Una col mofeta puede utilizar el calor para fundir la nieve, producir mal olor o atraer escarabajos y moscas.

COPY-STATION

un poro de la **ATP sintasa**. Para resaltar el papel crucial de la fuerza protón-motriz, la ecuación de la síntesis de ATP se escribe algunas veces como

$$ADP + P_i + nH^+_P \longrightarrow ATP + H_2O + nH^+_N \qquad (19\text{-}10)$$



Peter Mitchell, 1920–1992 [Fuente: AP Photo.]

Mitchell utilizó el término "quimiosmótico" para describir las reacciones enzimáticas en las que intervienen, simultáneamente, una reacción química y un proceso de transporte. El proceso global se conoce en ocasiones como "acoplamiento quimiosmótico". Aquí, "acoplamiento" hace referencia a la conexión *obligada* entre la síntesis mitocondrial de ATP y el flujo electrónico a través de la cadena respiratoria; ninguno de los dos procesos puede actuar sin el otro. En la **Figura 19-20** se muestra la definición operativa de acoplamiento. Cuando se suspenden mitocondrias aisladas en un tampón que contiene ADP, P_i y un sustrato oxidable tal como el succinato, tienen lugar tres procesos que pueden medirse fácilmente: (1) se oxida el sustrato (el succinato da fumarato), (2) se consume O_2 y (3) se sintetiza ATP. El consumo de oxígeno y la síntesis de ATP dependen de la presencia de un sustrato oxidable (en este caso el succinato), así como de ADP y P_i.



Henry Lardy, 1917–2010 [Fuente: © Cortesía de D. L. Nelson.]

Debido a que la oxidación del sustrato impulsa la síntesis de ATP los inhibidores de la transferencia electrónica bloqueen la síntesis de ATP (Fig. 19-20a). Lo contrario también se cumple: la inhibición de la síntesis de ATP bloquea la transferencia electrónica en mitocondrias intactas. Cuando se proporciona O_2 y sustratos oxidables pero no ADP a mitocondrias aisladas (Fig. 19-20b) no puede haber síntesis de ATP y no se da la transferencia electrónica al O_2. Henry Lardy, pionero en el uso de antibióticos para explorar la función mitocondrial, demostró el acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación utilizando oligomicina o venturicidina, antibióticos tóxicos que se unen a la ATP sintasa de la

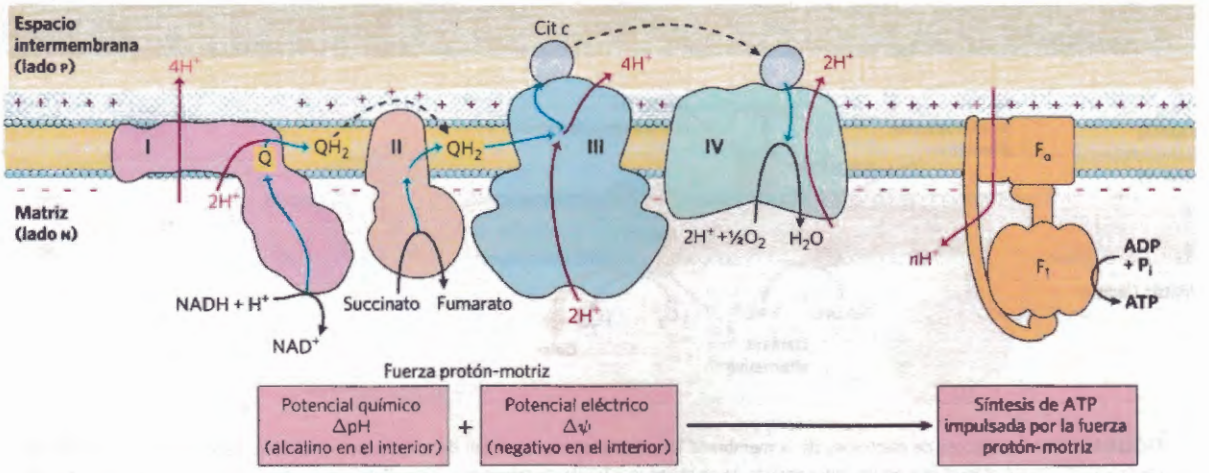


FIGURA 19-19 Modelo quimiosmótico. En esta representación sencilla de la teoría quimiosmótica aplicada a la mitocondria, los electrones del NADH y otros sustratos oxidables pasan a través de una cadena de transportadores distribuidos asimétricamente en la membrana interna. El flujo electrónico está acompañado de transferencia de protones a través de la membrana que producen un gradiente químico (ΔpH) y un gradiente eléctrico ($\Delta\psi$) que, combinados constituyen la fuerza protón-motriz. La membrana mitocondrial interna es impermeable a los protones; los protones sólo pueden volver a penetrar en la matriz a través de canales específicos de protones (F_o). La fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de los protones a la matriz proporciona la energía para la síntesis de ATP catalizada por el complejo F_1 asociado con F_o.

mitocondria. Estos compuestos son inhibidores potentes tanto de la síntesis de ATP *como* de la transferencia de electrones a través de la cadena de transportadores al O_2 (Fig. 19-20b). Dado que se sabe que la oligomicina no interacciona directamente con los transportadores electrónicos sino con la ATP sintasa, se desprende que la transferencia de electrones y la síntesis de ATP están obligatoriamente acopladas; una reacción no tiene lugar sin la otra.

La teoría quimiosmótica explica fácilmente la dependencia de la transferencia electrónica de la síntesis de ATP en la mitocondria. Cuando se bloquea el flujo de protones hacia la matriz a través del canal protónico de la ATP sintasa (por ejemplo con oligomicina), no hay una vía de retorno de los protones a la matriz, y la salida continua de protones impulsada por la actividad de la cadena respiratoria genera un gran gradiente de protones. La fuerza protón-motriz va aumentando hasta que el coste (energía libre) del bombeo de protones fuera de la matriz en contra de este gradiente es igual o superior a la energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH al O_2. Llegado este punto, el flujo de electrones ha de parar; la energía libre del proceso global del flujo de electrones acoplado al bombeo de protones es cero, y el sistema está en equilibrio.

Hay, no obstante, ciertas condiciones y reactivos que desacoplan la oxidación y la fosforilación. Cuando se rompen mitocondrias intactas mediante tratamiento con detergente o corte mecánico, los fragmentos membranosos resultantes aún puede catalizar la transferencia electrónica desde el succinato o el NADH al O_2 pero no hay síntesis de ATP acoplada a esta respiración. Ciertos compuestos químicos también producen el desacoplamiento sin romper la estructura mitocondrial. Entre los desacopladores químicos se encuentran el 2,4-dinitrofenol (DNP) y el carbonilcianuro-*p*-trifluoro-

Copy Station

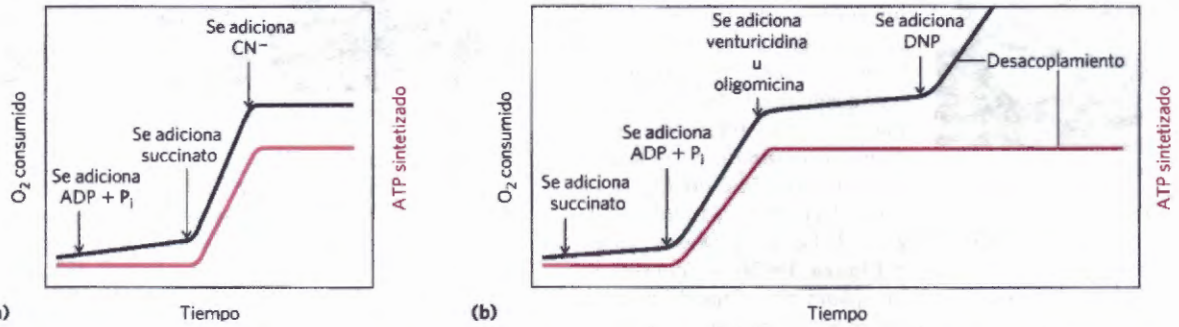


FIGURA 19-20 Acoplamiento de la transferencia electrónica con la síntesis de ATP en la mitocondria. En experimentos para demostrar el acoplamiento, se suspenden las mitocondrias en un medio tamponado y se utiliza un electrodo de O_2 para seguir el consumo de O_2. A intervalos se toman muestras que se analizan para determinar la presencia de ATP. **(a)** La adición de ADP y P_i solos no da lugar a ningún incremento, o muy poco, de la respiración (consumo de O_2; negro) o síntesis de ATP (rojo). Cuando se añade succinato empieza inmediatamente la respiración y se sintetiza ATP. La adición de cianuro (CN^-), que bloquea la transferencia de electrones entre la citocromo oxidasa (Complejo IV) y el O_2, inhibe tanto la respiración como la síntesis de ATP. **(b)** Las mitocondrias que contienen succinato sólo respiran y sintetizan ATP cuando se añaden ADP y P_i. La adición posterior de venturicidina u oligomicina, inhibidores de la ATP sintasa, bloquea tanto la síntesis de ATP como la respiración. El dinitrofenol (DNP) actúa como desacoplante, ya que permite que continúe la respiración sin síntesis de ATP.

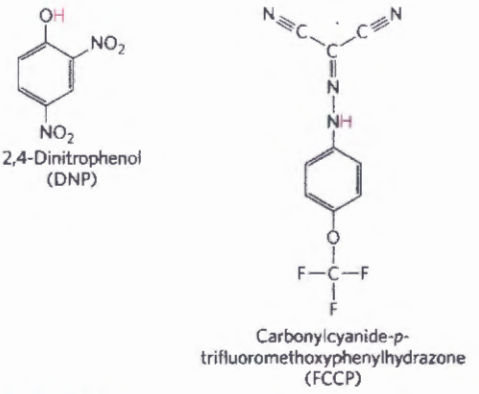


FIGURA 19-21 Dos desacoplantes químicos de la fosforilación oxidativa. DNP y FCCP contienen un protón disociable (rojo) y son muy hidrofóbicos. Transportan protones a través de la membrana mitocondrial interna disipando el gradiente de protones. Los dos también desacoplan la fotofosforilación.

metoxifenilhidrazona (FCCP) (Tabla 19-4; **Fig. 19-21**). Estos desacoplantes son ácidos débiles con propiedades hidrofóbicas que les permiten difundir fácilmente a través de la membrana mitocondrial. Una vez la forma protonada ha entrado en la matriz mitocondrial pueden liberar el protón, disipando de este modo el gradiente de protones. La estabilización por resonancia deslocaliza la carga de las formas aniónicas haciendo que sean lo suficientemente hidrofóbicas para volver a difundir a través de la membrana en donde pueden captar un protón y repetir el proceso. Los ionóforos tales como la valinomicina (véase la Fig. 11-42) permiten que los iones inorgánicos atraviesen fácilmente las membranas. Los ionóforos desacoplan la transferencia de electrones de la fosforilación oxidativa disipando a través de la membrana mitocondrial la contribución eléctrica al gradiente electroquímico.

Una predicción de la teoría quimiosmótica es que, dado que el papel de la transferencia de electrones en la síntesis mitocondrial de ATP es simplemente bombear protones para crear el potencial electroquímico de la fuerza protón-motriz, un gradiente de protones creado artificialmente debería poder reemplazar la transferencia de electrones como impulsor de la síntesis de ATP. La predicción se ha confirmado experimentalmente **(Fig. 19-22)**. Las mitocondrias manipuladas para imponer una diferencia en concentración de protones y una separación de cargas a través de la membrana interna sintetizan ATP *en ausencia de un sustrato oxidable*; la fuerza protón-motriz es por sí sola suficiente para impulsar la síntesis de ATP.

La ATP sintasa tiene dos dominios funcionales, F_o y F_1

La **ATP-sintasa** mitocondrial, es una ATPasa de tipo F (véase la Fig. 11-37b), similar en estructura y mecanismo a las ATP sintasas de bacterias y (tal como veremos en el Capítulo 20) de cloroplastos. Este gran complejo enzimático de la membrana mitocondrial interna cataliza la formación de ATP a partir de ADP y P_i, acompañado por el flujo de protones desde el lado p al n de la membrana (Ec. 19-10). La ATP sintasa, también denominada Complejo V, tiene dos componentes distintos: F_1, una proteína periférica de membrana, y F_o, que es

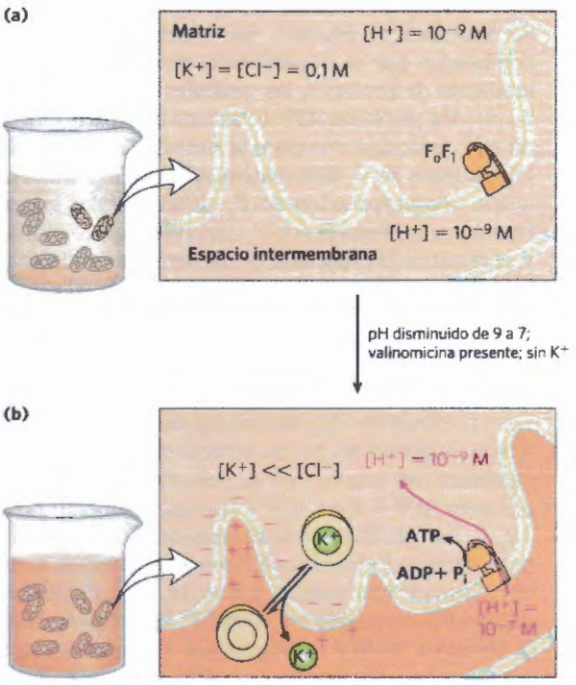


FIGURA 19-22 Demostración del papel de un gradiente de protones en la síntesis de ATP. Un gradiente electroquímico impuesto artificialmente puede impulsar la síntesis de ATP en ausencia de un sustrato oxidable como dador electrónico. En este experimento en dos pasos **(a)** se incuban primeramente mitocondrias aisladas en un tampón a pH 9 que contiene KCl 0,1 M. La lenta entrada de tampón y KCl a la mitocondria hace que finalmente la matriz se encuentre en equilibrio con el medio circundante. No se encuentran presentes sustratos oxidables. **(b)** Las mitocondrias se separan ahora del tampón de pH 9 y se resuspenden en tampón de pH 7 que contiene valinomicina pero no KCl. El cambio de tampón crea una diferencia de dos unidades de pH a través de la membrana interna de la mitocondria. El flujo de K^+ hacia el exterior, llevado a cabo por la valinomicina a favor del gradiente de concentración de ión K^+ pero sin un contraión, crea un desequilibrio de carga a través de la membrana (matriz negativa). La suma del potencial químico proporcionado por la diferencia de pH y el potencial eléctrico debido a la separación de cargas constituye una fuerza protón-motriz suficientemente grande para permitir la síntesis de ATP en ausencia de un sustrato oxidable.

una proteína integral de membrana. La letra del subíndice *o* en F_o indica que es sensible a la oligomicina. F_1, primer factor identificado como necesario para la fosforilación oxidativa, fue identificado y purificado por Efraim Racker y colaboradores a principios de la década de 1960.



Efraim Racker, 1913-1991 [Fuente: Division of Rare and Manuscript Collections, Cornell University Library.]

En el laboratorio, las pequeñas vesículas membranosas formadas a partir de la membrana mitocondrial interna llevan a cabo la síntesis de ATP acoplada a la transferencia electrónica. Cuando se extrae cuidadosamente la F_1, las vesículas "desnudas" aún contienen cadenas respiratorias intactas y la porción F_o de la ATP sintasa. Las vesículas pueden catalizar la transferencia de electrones del NADH al O_2, pero no producen un gradiente de

protones: F_o tiene un poro protónico a través del cual los protones se escapan tan rápidamente como son bombeados por la transferencia electrónica, y, sin un gradiente de protones, las vesículas que carecen de F_1 no pueden sintetizar ATP. F_1 aislada cataliza la hidrólisis de ATP (reacción inversa a la síntesis) lo cual hizo que inicialmente se la denominara **ATPasa F_1**. Cuando se añade una preparación de F_1 aislada a tales vesículas desnudas, se reasocia con F_o, tapando su poro protónico y se restaura la capacidad de las membranas de acoplar la transferencia electrónica y la síntesis de ATP.

En la superficie de F_1 el ATP está estabilizado en relación al ADP

Los experimentos de intercambio isotópico con F_1 purificada muestran un hecho notable sobre el mecanismo catalítico del enzima: en la superficie del enzima, la reacción ADP + P_i ↔ ATP + H_2O es fácilmente reversible: la energía libre de la síntesis de ATP es cercana a cero. Cuando F_1 hidroliza ATP en agua marcada con ^{18}O, el P_i formado contiene un átomo de ^{18}O. La medida cuidadosa del contenido en ^{18}O del P_i formado in vitro por la hidrólisis de ATP catalizada por F_1 muestra que el P_i contiene, no uno, sino tres o cuatro átomos de ^{18}O **(Fig. 19-23)**. Ello indica que el enlace pirofosfato terminal del ATP se rompe y rehace repetidamente antes de que el P_i abandone la superficie del enzima. Con el P_i libre para dar tumbos en su sitio de unión, cada hidrólisis inserta ^{18}O al azar en una de las cuatro posiciones del P_i. Esta reacción de intercambio se da en complejos F_oF_1 sin energía (sin gradiente protónico) y con F_1 aislada; el intercambio no requiere el aporte de energía.

Los estudios cinéticos de las velocidades iniciales de la síntesis e hidrólisis del ATP confirman la conclusión de que la $\Delta G'^{\circ}$ de la síntesis del ATP sobre el enzima es cercana a cero. A partir de las velocidades de hidrólisis medidas (k_1 = 10 s^{-1}) y de síntesis (k_{-1} = 24 s^{-1}), la constante de equilibrio calculada para la reacción

$$\text{Enz-ATP} \rightleftharpoons \text{Enz-(ADP + } P_i\text{)}$$

es

$$K'_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24\ s^{-1}}{10\ s^{-1}} = 2{,}4$$

A partir de esta K'_{eq}, la $\Delta G'^{\circ}$ aparente calculada es próxima a cero. Ello contrasta con la K'_{eq} de unos 10^5 ($\Delta G'^{\circ}$ = -30,5 kJ/mol) para la hidrólisis del ATP libre en solución (es decir, no en la superficie del enzima).

¿A qué se debe esta gran diferencia? La ATP sintasa estabiliza el ATP respecto al ADP + P_i uniendo el ATP más fuertemente, liberando la energía suficiente para contrarrestar el efecto de fabricar ATP. Las medidas cuidadosas de las constantes de unión muestran que F_oF_1 une ATP con una afinidad muy alta ($K_d \leq 10^{-12}$ m) y el ADP con una afinidad mucho menor ($K_d \approx 10^{-6}$ m). Esta diferencia en K_d se corresponde a una diferencia en energía de unión de unos 40 kJ/mol, y esta energía impulsa el equilibrio hacia la formación del producto ATP.

El gradiente de protones impulsa la liberación del ATP de la superficie del enzima

Aunque la ATP sintasa equilibra el ATP con ADP + P_i, el ATP recién sintetizado no abandona la superficie del enzima en ausencia de un gradiente de protones. Es el gradiente protónico el que provoca que el enzima libere el ATP formado en su superficie. El diagrama de la coordenada de la reacción del proceso **(Fig. 19-24)** muestra la diferencia entre el mecanismo de la ATP sintasa y el de muchos otros enzimas que catalizan reacciones endergónicas.

Para que la síntesis de ATP sea continua, el enzima debe ciclarse entre una forma que une ATP muy fuertemente y una forma que libera el ATP. Los estudios químicos y cristalográficos de la ATP sintasa revelan la base estructural de esta alternancia en la función.

COPYSTATION

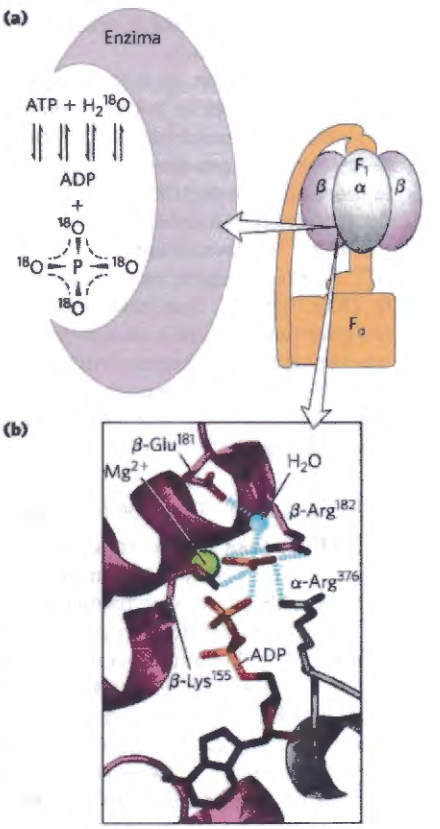


FIGURA 19-23 Mecanismo catalítico de F_1. **(a)** Experimento de intercambio de ^{18}O. F_1 solubilizado a partir de membranas mitocondriales se incuba con ATP en presencia de agua marcada con ^{18}O. A intervalos, se toma una muestra de la solución y se analiza la incorporación de ^{18}O en el P_i producido en la hidrólisis del ATP. En unos minutos, el P_i contiene tres o cuatro átomos de ^{18}O, lo que indica que tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP han tenido lugar varias veces durante la incubación. **(b)** Probable complejo del estado de transición para la síntesis e hidrólisis del ATP por la ATP sintasa (de PDB ID 1BMF). La subunidad α se muestra en gris, la β en púrpura. Los residuos cargados positivamente β-Arg^{182} y α-Arg^{376} coordinan dos oxígenos del intermedio fosfato pentacovalente; β-Lys^{155} interacciona con un tercer oxígeno y el ión Mg^{2+} estabiliza aún más el intermedio. La esfera azul representa el grupo saliente (H_2O). Estas interacciones tienen como resultado un rápido equilibrio de ATP y ADP + P_i en el sitio activo. [Fuente: **(b)** de PDB ID 1BMF, J. P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994.]

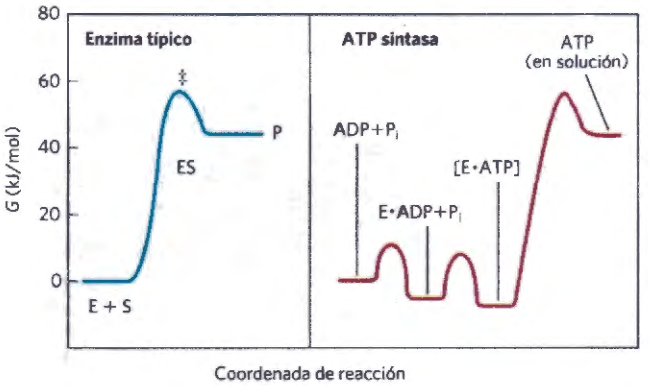
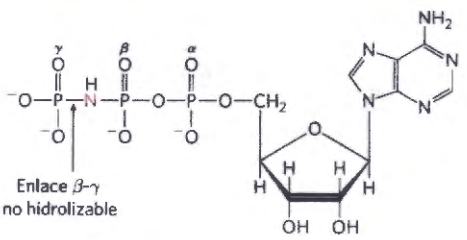


FIGURA 19-24 Diagramas de las coordenadas de reacción para la ATP sintasa y para un enzima más típico. En una reacción catalizada por un enzima típico (izquierda), alcanzar el estado de transición (‡) entre sustrato y producto es la principal barrera energética que se ha de superar. En la reacción catalizada por la ATP sintasa (derecha), la principal barrera es la liberación del ATP del enzima, no su formación. La variación de energía libre para la formación de ATP a partir de ADP y P_i en solución acuosa es grande y positiva, pero en la superficie del enzima la muy fuerte unión del ATP proporciona suficiente energía de unión para hacer que la energía libre del ATP ligado al enzima sea próxima a la del ADP + P_i, por lo que la reacción es fácilmente reversible. La constante de equilibrio es próxima a 1. La fuerza protón-motriz proporciona la energía libre necesaria para la liberación del ATP.

Cada subunidad β de la ATP sintasa puede adoptar tres conformaciones diferentes

La F_1 mitocondrial tiene nueve subunidades de cinco tipos distintos, con la composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Cada una de las tres subunidades β tiene un sitio catalítico para la síntesis de ATP. La determinación cristalográfica de la estructura de la F_1 por John E. Walker y sus colegas muestra detalles estructurales muy útiles para explicar el mecanismo catalítico del enzima. La porción en forma de pomo que sobresale de F_1 es una esfera aplanada de 8 nm por 10 nm formada por subunidades α y β alternadas, con una ordenación a modo de gajos de naranja **(Fig. 19-25a-c)**. Los polipéptidos que constituyen el tallo se ordenan de manera asimétrica en la estructura cristalográfica de F_1, con un dominio de la única subunidad γ actuando como un eje central que atraviesa F_1 y otro dominio de γ asociado principalmente con una de las tres subunidades β, la designada β-vacía (19-25b). Aunque la secuencia de aminoácidos de las tres subunidades β es idéntica, *sus conformaciones difieren* en parte por la asociación de la subunidad γ con sólo una de las tres.

Las diferencias en conformación entre las subunidades β se extienden a diferencias en sus sitios de unión de ATP/ADP. Cuando se cristaliza la proteína en presencia de ADP y App(NH)p, un análogo estructural muy parecido al ATP pero que no puede ser hidrolizado por la actividad ATPasa de F_1, se encontró App(NH)p en el sitio de unión de una de las tres subunidades β, ADP en otra, mientras que la tercera se encontraba vacía. Las correspondientes conformaciones de la subunidad β se denominan β-ATP, β-ADP y β-vacía (19-25b). Esta diferencia en la unión de nucleótidos entre las tres subunidades es esencial en el mecanismo del complejo.



App(NH)p (β,γ-imidoadenosina 5'-trifosfato)

El complejo F_o, con su poro protónico, está compuesto por tres subunidades, a, b, y c, en la proporción ab_2c_n, en donde n oscila entre 8 y 15 en diversos organismos. La subunidad c es un polipéptido pequeño (M_r 8.000), muy hidrofóbico que consiste casi exclusivamente en dos hélices transmembrana, con un pequeño bucle que se extiende desde el lado de la matriz de la membrana. La estructura cristalográfica de la F_oF_1 de levadura, resuelta en 1999, muestra el ordenamiento de las subunidades c. El complejo de levadura tiene 10 subunidades c, cada una de las cuales contiene dos hélices transmembrana aproximadamente perpendiculares al plano de la membrana, que se ordenan en dos círculos concéntricos. Los extremos amino de las hélices de cada subunidad c forman el círculo interno; el círculo externo, de unos 55 Å de diámetro, se forma con las hélices carboxilo terminales. *Las subunidades c en este anillo c giran conjuntamente como una unidad alrededor de un eje perpendicular a la membrana.* Las subunidades ε y γ forman una especie de pie y de pierna que sobresalen desde el lado de abajo de F_1 (membrana), sujetándose fuertemente en el anillo que forman las subunidades c. La subunidad a está formada por varias hélices hidrofóbicas que abarcan la membrana en asociación estrecha con una de las subunidades c del anillo c. Se puede combinar la información estructural obtenida en los estudios de F_1 bovina, de F_oF_1 de levadura y el anillo c del anaerobio estricto *Ilyobacter tartaricus* para obtener el dibujo esquemático de la Figura 19-25a.



John E. Walker [Fuente: © Findlay Kember/ Associated Press.]

La catálisis rotacional es la clave en el mecanismo de unión y cambio de la síntesis de ATP

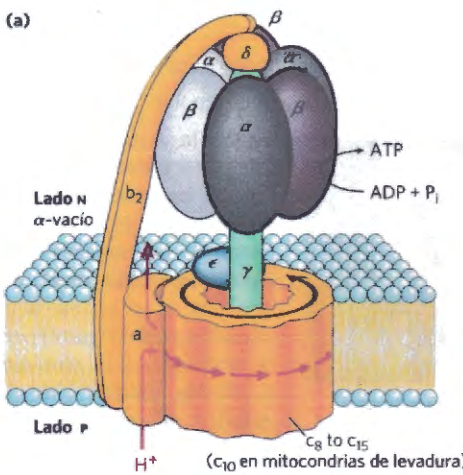


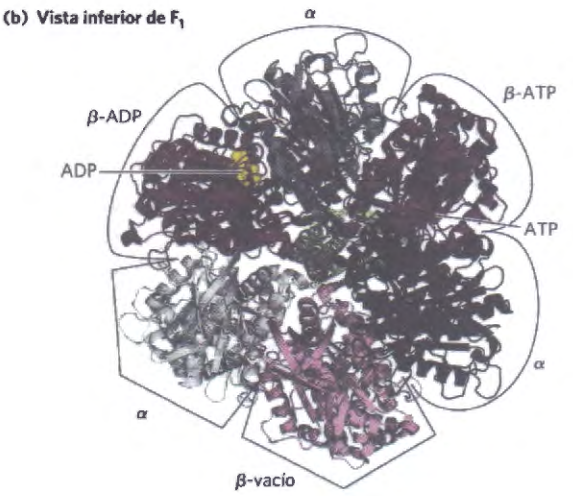
Paul Boyer [Fuente: Lacy Atkins/Associated Press/ AP Images.]

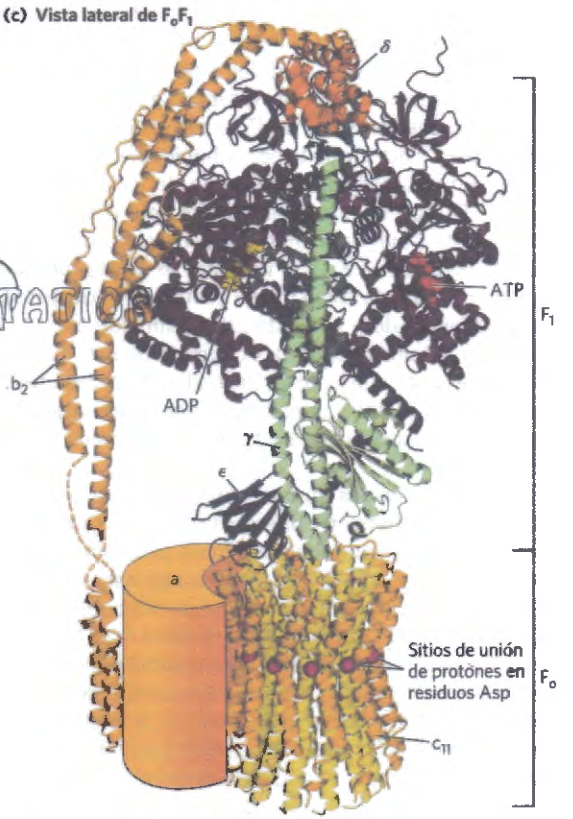
Sobre la base de estudios cinéticos y de unión detallados de las reacciones catalizadas por F_oF_1, Paul Boyer propuso un mecanismo de **catálisis rotacional** en el que los tres sitios activos situados sobre F_1 alternan en la catálisis de la síntesis de ATP **(Fig. 19-26)**. Una subunidad β determinada empieza en conformación β-ADP, que une ADP y P_i del medio.

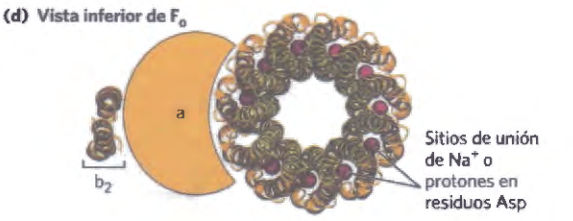
FIGURA 19-25 Complejo de la ATP sintasa mitocondrial. (a) Dibujo esquemático del complejo F_oF_1. **(b)** F_1 en visión superior (es decir, desde el lado N de la membrana), mostrando las tres subunidades β (tonalidades púrpura) y las tres subunidades α (tonalidades de gris) y el eje central (subunidad γ, verde). Cada subunidad β, cerca de su interfase con la subunidad α vecina, tiene un sitio de unión a nucleótidos esencial en la actividad catalítica. La única subunidad γ se asocia principalmente con uno de los tres pares $\alpha\beta$, provocando que cada una de las tres subunidades β tenga una conformación ligeramente diferente con diferentes sitios de unión a nucleótidos. En el enzima cristalino, una subunidad, β-ADP, contiene ADP (amarillo) en su sitio de unión, la siguiente, β-ATP, contiene ATP (rojo), y la tercera, β-vacía, no contiene nucleótido unido.

(c) Visión lateral del enzima completo (en el plano de la membrana). La porción F_1 tiene tres subunidades α y tres β ordenadas a modo de gajos de naranja alrededor de un eje central, la subunidad γ (verde). (Se han omitido dos subunidades α y una β para poder visualizar la subunidad γ y los sitios de unión del ATP y ADP en las subunidades β). La subunidad δ confiere sensibilidad a la oligomicina sobre la ATP sintasa y la subunidad ϵ puede servir para inhibir la actividad ATPasa del enzima en algunas circunstancias. La subunidad F_o está compuesta por una subunidad a y dos subunidades b que anclan el complejo F_oF_1 en la membrana y actúan como un estátor, manteniendo las subunidades α y β en su sitio. F_o también incluye el anillo c formado por subunidades c idénticas (entre 8 y 15, según la especie) que son proteínas pequeñas e hidrofóbicas. El anillo c y la subunidad a interaccionan y proporcionan un paso transmembrana para los protones. Cada subunidad c tiene un residuo Asp crítico cerca del centro de la membrana que experimenta protonación/desprotonación durante el ciclo catalítico de la ATP sintasa. Aquí se muestra el anillo c_{11} homólogo perteneciente a la Na^+-ATPasa de *Ilyobacter tartaricus*, de la que se conoce bien su estructura. En él, los sitios de unión de Na^+, que se corresponden con los sitios de unión de protones del complejo F_oF_1 se muestran con sus iones Na^+ unidos (esferas rojas). **(d)** Visión de F_o perpendicular a la membrana. Al igual que en (c), las esferas rojas representan los sitios de unión de Na^+ o sitios de unión de protones en los residuos Asp. [Fuentes: F_1: PDB ID 1BMF, J. P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994, PDB ID 1JNV, A. C. Hausrath et al., *J. Biol. Chem.* 276:47.227, 2001; PDB ID 2A7U, S. Wilkens et al., *Biochemistry* 44:11.786, 2005; PDB ID 2CLY, V. Kane Dickson et al., *EMBO J.* 25:2911, 2006; F_o PDB ID 1B9U, O. Dmitriev et al., *J. Biol. Chem.* 274:15.598, 1999; anillo c: PDB IC 1YCE, T. Meier et al., *Science* 308:659, 2005.]









A continuación la subunidad cambia de conformación, adoptando la forma β-ATP que une y estabiliza fuertemente el ATP, lo que comporta el rápido equilibrio del ADP + P_i con el ATP en la superficie del enzima. Finalmente, la subunidad cambia hacia la conformación β-vacía, que tiene una afinidad muy baja por el ATP, por lo que el ATP recién sintetizado se libera de la superficie del enzima. Cuando esta subunidad vuelve a adoptar la conformación β-ADP y une ADP + P_i, se inicia otra ronda de catálisis.

Los cambios de conformación, esenciales en este mecanismo, están impulsados por el paso de protones a través de la porción F_o de la ATP sintasa. La corriente de protones a través del poro F_o hace que el cilindro formado por las subunidades c y la subunidad γ anclada giren alrededor del eje mayor de γ, que es perpendicular al plano de la membrana. La subunidad γ pasa a través del centro del esferoide $\alpha_3\beta_3$, que se mantiene quieto respecto a la superficie de la membrana gracias a las subunidades b_2 y δ (Fig. 19-25a). Con cada rotación de 120°, γ se pone en contacto con una subunidad β diferente, y el contacto provoca el cambio de la subunidad β a la conformación β-vacía.

Las tres subunidades β interaccionan de tal modo que cuando una adopta la conformación β-vacía, la vecina de un lado *ha de* adoptar la conformación β-ADP, y la del otro la β-ATP. Por lo tanto, una rotación completa de la subunidad γ provoca que cada subunidad β se cicle a través de sus tres conformaciones posibles, y en cada rotación se sintetizan y se liberan de la superficie del enzima tres moléculas de ATP.

Una predicción importante de este **modelo de unión y cambio** es que la subunidad γ debería rotar en un sentido cuando F_oF_1 sintetiza ATP, y en el sentido opuesto cuando lo hidroliza. Está predicción se demostró con los elegantes experimentos realizados en los laboratorios de Masasuke Yoshida y Kazuhiko Kinosita, Jr. La rotación de γ en una única molécula de F_1 se visualizó en un microscopio gracias a la unión a γ de un polímero de actina fluorescente, molécula larga y delgada, y observando como, al hidrolizarse ATP, se mueve en relación a $\alpha_3\beta_3$ que había sido inmovilizada previamente en un portaobjetos del microscopio. (La esperada inversión de la rotación cuando se estaba sintetizando ATP no se pudo probar en este experimento; no existe un gradiente protónico que impulse la síntesis de ATP). Cuando se realizó el mismo experimento con el complejo F_oF_1 completo (no únicamente F_1) la totalidad del anillo formado por subunidades c rotó junto con γ **(Fig. 19-27)**. La "varilla" rotó en la dirección predicha los 360°. La rotación no fue suave, sino que se dio en tres pasos discretos de 120°. La eficiencia de este mecanismo al convertir energía química en movimiento es cercana al 100%, como se puede calcular a partir de la velocidad de hidrólisis conocida de ATP por una molécula de F_1 y la fuerza de fricción sobre el largo polímero de actina. En palabras de Boyer "¡una máquina molecular espléndida!"

¿De qué modo el flujo protónico a través del Complejo F_o produce movimiento rotatorio?

En la **Figura 19-28** se muestra un modelo posible que explica de qué modo el flujo electrónico y el movimiento rotatorio están acoplados en el Complejo F_o. Las subunidades individuales de F_o están dispuestas en un círculo alrededor de un núcleo central que está relleno, probablemente, de lípidos de membrana. En cada subunidad c hay un residuo Asp (o Glu) crítico localizado aproximadamente en el centro de la membrana. Los protones cruzan la membrana a través de una ruta formada por subunidades a y c. La subunidad a tiene un semicanal protónico que va desde el lado p (citosol) al centro de la membrana, donde termina cerca del residuo Asp de la subunidad c vecina. Un protón difunde desde el lado p (en donde la concentración de protones es relativamente elevada) a través de este semicanal y se une al residuo Asp, eliminando la carga negativa del grupo carboxilo y desplazando, de este modo, un residuo Arg cargado positivamente que había estado asociado al Asp. Este residuo Arg bascula lateralmente y

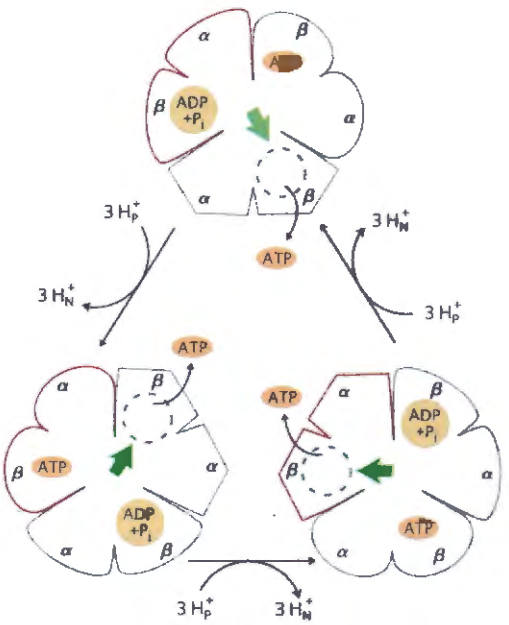
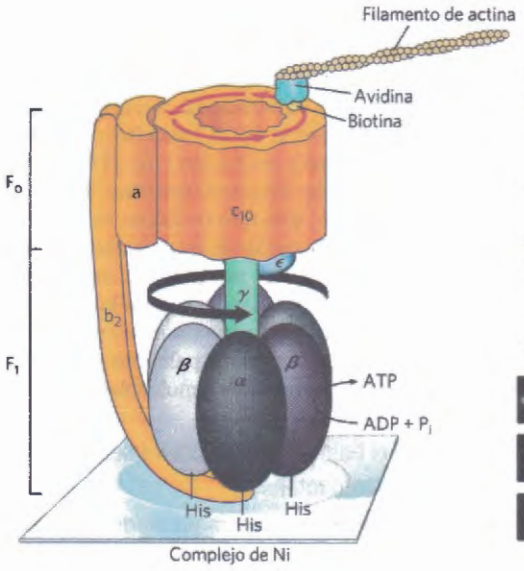


FIGURA 19-26 Modelo de cambio de unión para la ATP sintasa. El complejo F_1 tiene tres sitios de unión de nucleótidos de adenina no equivalentes, uno por cada par de subunidades α y β. En un momento determinado, uno de estos sitios está en la conformación β-ATP (que une ATP fuertemente), un segundo está en la conformación β-ADP (unión débil) y un tercero está en la conformación β-vacía (unión muy débil). En esta vista desde el lado N la fuerza protón-motriz hace que el eje central, subunidad γ, mostrada como una flecha verde, se ponga en contacto con cada par de subunidades $\alpha\beta$ de forma sucesiva. Ello produce un cambio de conformación cooperativo en el que el sitio β-ATP se convierte en la conformación β-vacía y el ATP se disocia; el sitio β-ADP se convierte en la conformación β-ATP, que promueve la condensación del ADP y P_i unidos para formar ATP; y el sitio β-vacío se convierte en un sitio β-ADP, que une débilmente ADP y P_i que difunden desde el disolvente. Este modelo, basado en observaciones experimentales, requiere que al menos dos de los tres sitios catalíticos alternen en actividad; el ATP no se puede liberar de uno de los sitios hasta que se fijen ADP y P_i al otro. Observe que la dirección de rotación cambia de sentido cuando la ATP sintasa actúa como una ATPasa como, por ejemplo, en el experimento mostrado en la Figura 19-27.



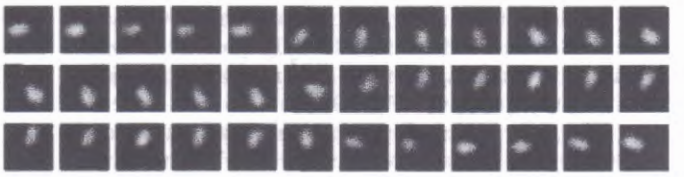


FIGURA 19-27 Demostración experimental de la rotación de F_o y γ. F_1 rediseñado por técnicas de ingeniería genética para contener una serie de residuos His se une fuertemente a un portaobjetos de microscopio recubierto con un complejo de Ni; se une biotina covalentemente a una subunidad c de F_o. La proteína avidina, que se une muy fuertemente a la biotina, está unida covalentemente a largos filamentos de actina marcados con una sonda fluorescente. La unión de biotina-avidina une ahora los filamentos de actina a la subunidad c. Cuando se aporta ATP como sustrato de la actividad ATPasa de F_1, se observa que el filamento marcado gira continuamente en una dirección, y ello demuestra que gira el cilindro F_o de subunidades c. En otro experimento, el filamento de actina fluorescente se unió directamente sobre la subunidad γ. La serie de micrografías de fluorescencia (leídas de izquierda a derecha) muestra la posición del filamento de actina a intervalos de 133 ms. Observe que, a medida que gira el filamento, se produce un salto discreto cada once marcos. Probablemente el cilindro y el eje se mueven como una unidad. [Fuentes: Cartoon Information de Y. Sambongi et al., *Science* 286:1722, 1999. Micrografías: Cortesía de Riohel Yasuda y Kazuhiko Kinosita, de Yasuda et al., *Cell* 93:1117, 1998.© Elsevier.]

establece una interacción con el Asp de la subunidad c vecina en el anillo al tiempo que desplaza el protón del Asp; este protón sale a través del segundo semicanal al lado n, en donde las concentración de protones es relativamente baja, lo que completa la transferencia de un equivalente de prones desde el exterior al interior de la matriz. En este momento otro protón ha entrado en el semicanal en el lado p, se ha desplazado hasta el Asp de la siguiente subunidad c, la ha protonado

(de nuevo desplazando Arg), la cual desplaza a su vez un protón de la siguiente subunidad c, y así sucesivamente. El movimiento rotacional del anillo c es el resultado del movimiento térmico (browniano), que se hace unidireccional debido a la gran diferencia en la concentración de protones a través de la membrana. El número de protones que han de ser transferidos para producir una rotación completa del anillo c es igual al número de subunidades c del anillo. Estudios del anillo c con microscopia de fuerza atómica (Recuadro 19-3) o difracción de rayos X han demostrado que el número de subunidades c es diferente en organismos diferentes. **(Fig. 19-29)**. En mitocondrias bovinas el número es 8, en mitocondrias de levadura y *E. coli* es 10 y el número de subunidades c puede ser tan elevado como 15 en la

Copy-Station

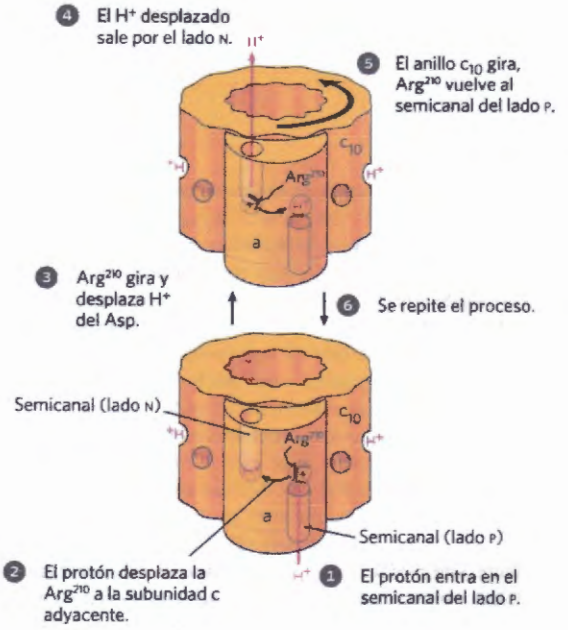


FIGURA 19-28 Modelo de rotación del anillo c impulsada por protones. La subunidad a del complejo F_o de la ATP sintasa (véase la Fig. 19-25a) tiene dos semicanales hidrofílicos para protones, uno que va desde el lado P al centro de la membrana, el otro desde el centro de la membrana al lado N (matriz). Las subunidades c individuales en F_o (10 en el enzima de levadura) se disponen en un círculo alrededor de un núcleo central. Cada subunidad c tiene un residuo Asp crítico aproximadamente a medio camino a través de la membrana que puede ceder o aceptar un protón (H^+ rojo). La subunidad tiene una cadena lateral de Arg cargada positivamente que establece una interacción electrostática con el carboxilato cargado negativamente del Asp de la subunidad c vecina. Esta subunidad c está posicionada inicialmente de modo que un protón que entra en el semicanal por el lado P (en donde la concentración de protones es relativamente alta) encuentra y protona el residuo Asp debilitando su interacción con la Arg. La cadena lateral de la Arg gira hacia el residuo Asp protonado de la siguiente subunidad c y desplaza su protón del carboxilo, al tiempo que se forma una nueva interacción electrostática Arg-Asp. El protón desplazado se mueve a través del segundo semicanal en la subunidad a y se libera en el lado N. La subunidad c con su residuo Asp desprotonado se mueve de modo que su par Arg-Asp queda orientado al semicanal del lado P con lo que se inicia un segundo ciclo: entrada de un protón, protonación de Asp, desplazamiento de Arg y salida del protón. La rotación del anillo tiene lugar por moción térmica (browniana) y se engrana de manera efectiva. La orientación del gradiente de protones dicta la dirección del flujo protónico con lo que se consigue una rotación del anillo c prácticamente unidireccional. [Fuente: PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003.]

RECUADRO 19-3 MÉTODOS Microscopia de fuerza atómica para visualizar las proteínas de membrana

En la **microscopia de fuerza atómica (AFM)**, la punta fina de una sonda microscópica unida a un brazo de palanca flexible se desplaza por una superficie desigual como, por ejemplo, una membrana (Fig. 1). Las interacciones electrostáticas y de van der Waals entre la punta y la muestra produce una fuerza que mueve la sonda arriba y abajo (en la dimensión z) a medida que encuentra colinas y valles en la muestra. Un rayo láser reflejado por el brazo de palanca detecta movimientos muy pequeños, del orden de 1 Å. En un tipo de microscopio de fuerza atómica, se mantiene constante la fuerza sobre la sonda (relativa a una fuerza estándar, del orden de piconewtons) mediante un circuito de retroalimentación que que hace que la plataforma que sostiene la muestra suba o baje para mantener la fuerza constante. Una serie de barridos en las dimensiones x e y (el plano de la membrana) proporciona un mapa de contorno tridimensional de la superficie con una resolución próxima a la escala atómica (0,1 nm en la dimensión vertical, 0,5 a 1,0 nm en las dimensiones laterales).

En casos favorables la AFM se puede utilizar para estudiar moléculas proteicas de membrana individuales, tales como las subunidades c del complejo F_o (Fig. 19-29c, d).

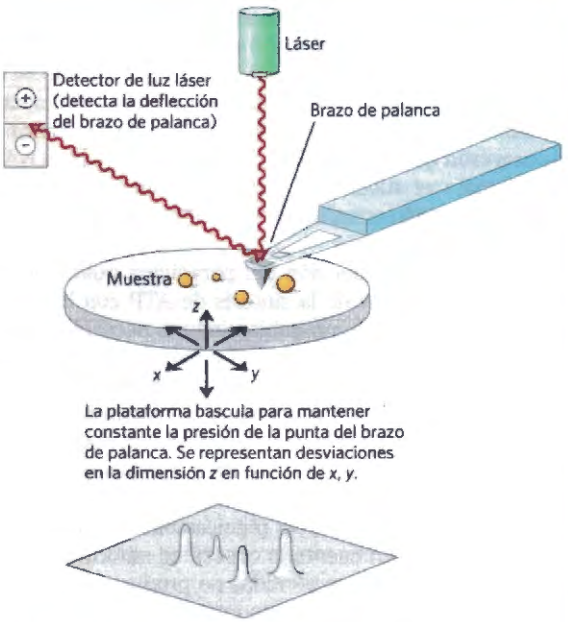


FIGURA 1 Principio de la microscopia de fuerza atómica.

COPY-STATION

cianobacteria *Spirulina platensis*. Se ha calculado que la velocidad de rotación en mitocondrias intactas es de unas 6.000 rpm (unas 100 rotaciones por segundo).

El acoplamiento quimiosmótico permite que las estequiometrías del consumo de O_2 y de la síntesis de ATP no se correspondan con números enteros

Antes de la aceptación general del modelo quimiosmótico de la fosforilación oxidativa se pensaba que la ecuación de la reacción global tendría la siguiente forma:

$$x\text{ADP} + x\text{P}_i + \tfrac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADH} \longrightarrow x\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \quad (19\text{-}11)$$

siendo siempre el valor de x, algunas veces llamado la **razón P/O** o **razón P/2e⁻**, un número entero. Tanto la síntesis de ATP como el consumo de O_2 se pueden

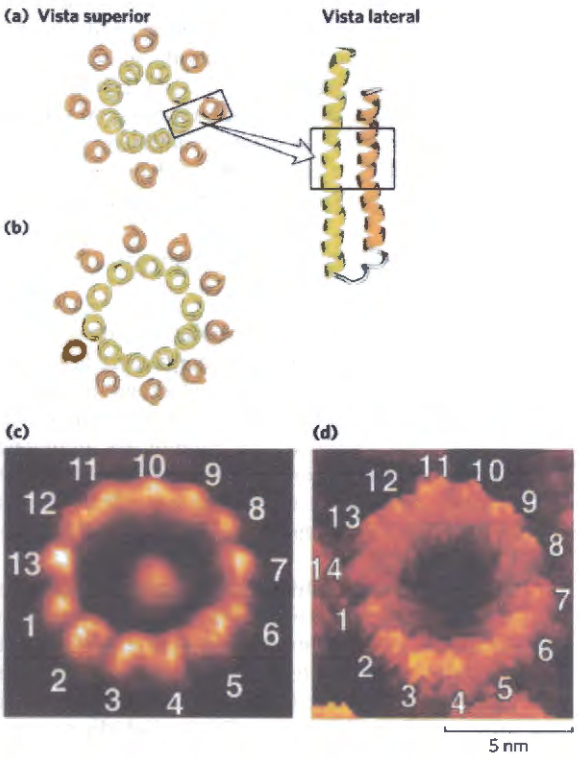


FIGURA 19-29 Diferencias entre especies en el número de subunidades c en el anillo c del complejo F_o. Se han determinado las estructuras del anillo c de diversas especies mediante cristalografía de rayos X. Cada hélice del anillo interior constituye la mitad de una subunidad c que tiene forma de horquilla. El residuo Asp esencial en la posición 61 se muestra como un punto rojo. Las vistas del anillo c perpendiculares a la membrana muestran el número de subunidades c para **(a)** la mitocondria bovina (8 subunidades) y **(b)** la mitocondria de levadura (10). Se ha utilizado la microsccopia de fuerza atómica (véase el Recuadro 19-3) para visulizar los anillos c de **(c)** una bacteria termofílica *Bacillus especies* TA2.A1 (13) y **(d)** espinaca (14). Según el modelo de la Fig. 19-28 diferentes números de subunidades c en el anillo c deberían rendir razones diferentes de ATP formado por par de electrones que pasan a través de la cadena respiratoria (es decir, diferentes razones P/O). [Fuentes: **(a)** PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003, **(c)** D. Matthies et al., *J. Mol. Biol.* 388:611, 2009. **(d)** H. Seelert et al., *Nature* 405:418, 2000. Reproducido con permiso de Macmillan Publishers Ltd.]

medir si se suspenden mitocondrias intactas en una solución con un sustrato oxidable, tal como el succinato o el NADH, y se aporta O_2. En principio, estas dos medidas habrían de proporcionar el número de ATP sintetizados por $\frac{1}{2}O_2$ consumido, la razón P/O. La mayor parte de los experimentos daban una razón P/O (ATP a $\frac{1}{2}O_2$) de entre 2 y 3 cuando se utilizaba NADH como dador de electrones, y entre 1 y 2 cuando se utilizaba succinato. Dando por sentado que P/O había de dar un número entero, la mayor parte de los científicos creyeron que la razón P/O debía ser de 3 para el NADH y 2 para el succinato, y durante muchos años estos valores se han encontrado en artículos de investigación y en libros de texto.

Con la introducción del paradigma quimiosmótico del acoplamiento de la síntesis de ATP con la transferencia electrónica, no había ninguna necesidad teórica de que la razón P/O fuera un número entero. Las preguntas pertinentes sobre la estequiometría se transformaron en: ¿cuántos protones se bombean hacia afuera por la transferencia electrónica desde un NADH al O_2? y ¿cuántos protones han de entrar a través de complejo F_oF_1 para impulsar la síntesis de un ATP? La medida de los flujos de protones es técnicamente complicada; se han de tener en cuenta la capacidad amortiguadora de las mitocondrias, las pérdidas no productivas de protones a través de la membrana interna y el uso de gradientes de protones en funciones diferentes de la síntesis de ATP, tales como el transporte de sustratos a través de la membrana mitocondrial interna (descrito más adelante). Los valores experimentales consenso de los protones que se bombean hacia afuera por par de electrones es de 10 para el NADH y de 6 para el succinato. El valor experimental más aceptado para el número de protones necesarios para impulsar la síntesis de una molécula de ATP es de 4, de los cuales uno se utiliza en el transporte de P_i, ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial (véase más adelante). Si por cada NADH se bombean hacia afuera 10 protones y para producir un ATP han de entrar 4, la razón P/O basada en los protones es de 2,5 cuando el NADH es el dador y 1,5 (6/4) cuando lo es el succinato. No obstante, tal como veremos en el Ejemplo práctico 2, la estequiometría protónica de la síntesis de ATP por la ATP sintasa depende del número de unidades c en F_o, que va de 8 a 15 según la especie.

La fuerza protón-motriz suministra energía para el transporte activo

Aunque el papel principal del gradiente de protones en la mitocondria es suministrar energía para la síntesis de ATP la fuerza protón-motriz también sirve para impulsar varios procesos de transporte esenciales para la fosforilación oxidativa. La membrana mitocondrial interna es generalmente impermeable a las especies cargadas, pero hay dos sistemas específicos que transportan ADP y P_i a la matriz y ATP hacia el citosol exterior **(Fig. 19-30)**.

La **nucleótido de adenina translocasa**, integral de la membrana interna, une ADP^{3-} en el espacio intermembrana y lo transporta a la matriz en intercambio con una molécula de ATP^{4-} transportada simultáneamente hacia el exterior (véase la Fig. 13-11 para las formas iónicas del ATP y ADP). Debido a que este cotransportador antiparalelo transporta cuatro cargas negativas hacia fuera a cambio de tres que entran, su actividad viene favorecida por el gradiente electroquímico transmembrana que proporciona a la matriz una carga neta negativa; la fuerza protón-motriz impulsa el intercambio ATP-ADP. La nucleótido de adenina translocasa es inhibida específicamente por el atractilósido, un glucósido tóxico producido por una especie de cardo. Si se inhibe el transporte de ADP al interior y de ATP al exterior de la mitocondria, no se puede regenerar el ATP citosólico a partir del ADP, lo que explica la toxicidad del atractilósido.

Un segundo sistema de transporte de la membrana esencial para la fosforilación oxidativa es la **fosfato translocasa**, que promueve el cotransporte paralelo de un $H_2PO_4^-$ y un H^+ al interior de la matriz. Este proceso de transporte también está favorecido por el gradiente de protones transmembrana (Fig. 19-30). Observe que el proceso requiere que un protón pase del lado p al lado n de la membrana interna, consumiendo parte de la energía de la transferencia electrónica. Mediante disección suave de la mitocondria con detergentes puede aislarse un complejo de la ATP sintasa y las dos translocasas, el **ATP sintasoma,** lo que sugiere que las funciones de estas tres proteínas están fuertemente integradas.

ATP y ADP cruzan la membrana mitocondrial externa vía un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)

COPY-STATION

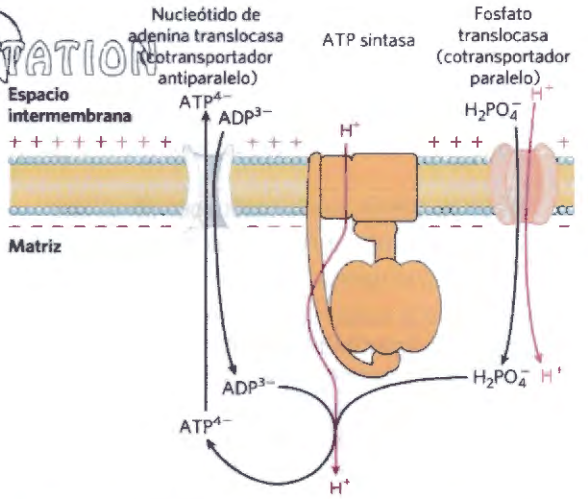


FIGURA 19-30 Nucleótido de adenina y fosfato translocasas. Sistemas de transporte de la membrana mitocondrial interna transportan ADP y P_i al interior de la matriz y ATP recién sintetizado al citosol. La nucleótido de adenina translocasa es un sistema de cotransporte antiparalelo; la misma proteína lleva ADP a la matriz y ATP al exterior. El efecto de reemplazar ATP^{4-} por ADP^{3-} en la matriz es la salida neta de una carga negativa, lo que está favorecido por la diferencia de carga a través de la membrana interna (exterior positivo). A pH 7, el P_i se halla presente tanto en forma de HPO_4^{2-} como de $H_2PO_4^-$; la fosfato translocasa es específica para $H_2PO_4^-$. No hay flujo neto de carga durante el cotransporte paralelo de $H_2PO_4^-$ y H^+ pero la concentración de protones relativamente baja en la matriz favorece el movimiento de H^+ hacia el interior. De este modo la fuerza protón-motriz es responsable tanto de proporcionar la energía para la síntesis de ATP como del transporte de sustratos (ADP y P_i) al interior y del producto (ATP) fuera de la matriz mitocondrial. Estos tres sistemas de transporte se pueden aislar como un único complejo ligado a la membrana (ATP sintasoma).

que es un barril β de 19 hebras (véase la Fig. 11-11) con una apertura de unos 27 Å de anchura que conecta el citosol con el espacio intermembrana. Cada VDAC, cuando está abierto, puede transportar 10^5 moléculas de ATP por segundo. La apertura está accionada por voltaje, tal como indica su nombre, y en algunas condiciones VDAC está cerrado al ATP.

EJEMPLO PRÁCTICO 19-2 Estequiometría de la producción de ATP: Efecto del tamaño del anillo c

(a) Si la ATP sintasa de mitocondrias *bovinas* tiene 8 subunidades c por cada anillo c ¿Cuál es la razón predicha de ATP formado por NADH oxidado? (b) ¿Cuál es el valor predicho para la mitocondria de *levadura* con 10 subunidades c por ATP sintasa? (c) ¿Cu<les son los valores correspondientes para los electrones que entran en la cadena respiratoria a partir del $FADH_2$?

Solución: (a) La pregunta nos pide determinar cuantos ATP se producen por NADH. Esta es otra manera de pedirnos que calculemos la razón P/P, o x en la Ecuación 19-11. Si el anillo c tiene 8 subunidades c, una vuelta completa transferirá 8 protones a la matriz y producirá 3 moléculas de ATP. Pero esta síntesis también requiere el transporte de 3 P_i al interior de la matriz, a un coste de 1 protón por cada P_i, por lo que se han de sumar 3 protones más al número total requerido. Esto hace que el coste total sea (11/protones)/(3 ATP) = 3,7 protones/ATP. El valor generalmente aceptado para el número de protones bombeados al exterior por par de electrones transferidos desde el NADH es 10 (Ec. 19-7). Por tanto, la oxidación de 1 NADH produce (10 protones)/(3,7 ATP) = 2,7 ATP.

(b) Si el anillo c tiene 10 subunidades c, una rotación completa transfiere 10 protones a la matriz y produce 3 moléculas de ATP.La suma de los 3 protones para transportar 3 P_i a la matriz lleva el coste total a (13 protones)/ (3 ATP) = 4,3 protones/ATP. La oxidación de 1 NADH produce (10 protones)/(4,3 protones/ATP) = 2,3 ATP.

(c) Cuando los electrones entran en la cadena respiratoria desde el $FADH_2$ (en la ubiquinona), sólo hay 6 protones disponibles para impulsar la síntesis de ATP. Esto modifica el cálculo para la mitocondria bovina a (6 protones)/(3,7 protones/ATP) = 1,6 ATP por par de electrones desde el $FADH_2$. Para la mitoconbdria de levadura, el cálculo es (6 protones)/(4,3 protones/ATP) = 1,4 ATP por par de electrones desde el $FADH_2$.

Estos valores calculados de x o la razón P/O define una gama que incluye los valores de 2.5 ATP/NADH y 1,4 ATP/$FADH_2$, por lo que utilizaremos estos valores a lo largo de este libro.

Sistemas de lanzadera envían indirectamente NADH citosólico a la mitocondria para su oxidación

La NADH deshidrogenasa de la membrana mitocondrial interna de células animales sólo puede aceptar electrones del NADH de la matriz. Dado que la membrana interna no es permeable al NADH, ¿cómo puede reoxidarse el NADH generado por la glucólisis en el citosol a NAD^+ por el O_2 vía la cadena respiratoria? Sistemas especiales de lanzadera transportan equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a las mitocondrias mediante una ruta indirecta. La lanzadera de NADH más activa, que funciona en las mitocondrias de hígado, riñón y corazón, es la **lanzadera del malato-aspartato (Fig. 19-31)**. Los equivalentes de reducción del NADH citosólico se transfieren en primer lugar al oxalacetato citosólico obteniéndose malato por acción de la malato deshidrogenasa citosólica. El malato así formado pasa a través de la membrana interna mediante el sistema de transporte del malato-α-cetoglutarato. Dentro de la matriz los equivalentes de reducción pasan por acción de la malato deshidrogenasa mitocondrial al NAD^+ formando NADH; este NADH puede pasar electrones de forma directa a la cadena respiratoria. En el paso de este par de electrones al O_2 se generan unas 2,5 moléculas de ATP. El oxalacetato citosólico debe regenerarse mediante reacciones de transaminación así como mediante la actividad de los transportadores de membrana para empezar otro ciclo de la lanzadera.

El músculo esquelético y el cerebro utilizan una lanzadera diferente del NADH, la **lanzadera del glicerol-3-fosfato (Fig. 19-32)**. Difiere de la lanzadera del malato-aspartato en que cede los equivalentes de reducción desde el NADH a través del FAD de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa a la ubiquinona y de ella al Complejo III, no al Complejo I (Fig. 19-15) con lo que sólo proporciona energía para la síntesis de 1,5 moléculas de ATP por par de electrones.

Las mitocondrias de las plantas tienen una NADH deshidrogenasa orientada hacia el *exterior* que puede transferir electrones directamente desde el NADH citosólico a la cadena respiratoria al nivel de la ubiquinona. Debido a que esta vía no utiliza el paso por la NADH deshidrogenasa del Complejo I y el movimiento de protones asociado, la cantidad de ATP producida a partir del NADH citosólico es menor que la producida a partir del NADH generado en la matriz (Recuadro 19-2).

RESUMEN 19.2 Síntesis de ATP

- El flujo de electrones a través de los Complejos I, III y IV da lugar al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna haciendo que la matriz sea alcalina con respecto al espacio intermembrana. Este gradiente de protones suministra la energía, en la forma de fuerza protón-motriz, para la síntesis del ATP a partir del ADP y P_i por la ATP sintasa, (complejo F_oF_1) de la membrana interna.
- La ATP sintasa lleva a cabo "catálisis rotacional" en la que el flujo de protones a través de F_o hace que cada uno de los tres sitios de unión de nucleótidos de F_1 cicle desde la conformación que une (ADP + P_i) a la que une ATP y finalmente a la vacía.
- La formación del ATP por el enzima requiere poca energía; el papel de la fuerza protón-motriz es empujar el ATP fuera de su sitio de unión en la sintasa.
- La proporción de ATP sintetizado por $\frac{1}{2}O_2$ reducido a H_2O (la razón P/O) es de unos 2,5 cuando los electrones entran en la cadena respiratoria en el Complejo I y de 1,5 cuando los electrones entran en la ubiquinona. Esta proporción varía entre especies según el número de subunidades c en el complejo F_o.

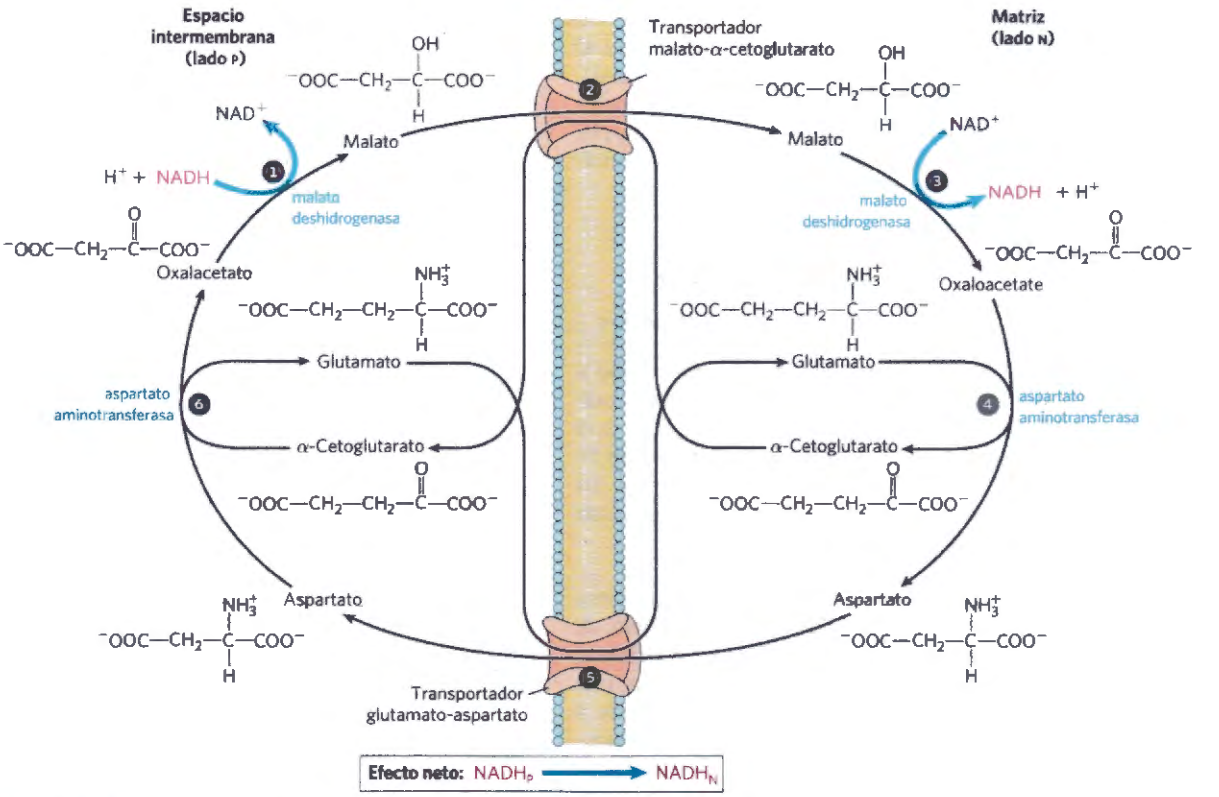
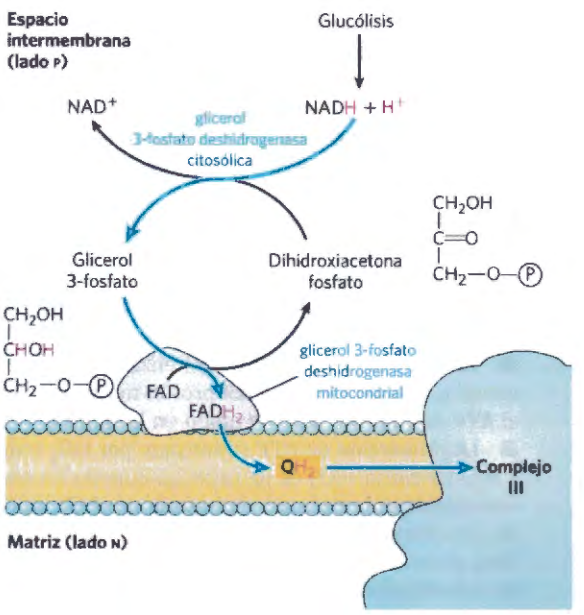


FIGURA 19-31 Lanzadera del malato-aspartato. Esta lanzadera para transportar equivalentes de reducción desde el NADH citosólico a la matriz mitocondrial se utiliza en hígado, riñón y corazón. ❶ El NADH del citosol entra en el espacio intermembrana a través de aberturas en la membrana externa (porinas), y a continuación pasa dos equivalentes de reducción al oxalacetato produciendo malato. ❷ El malato atraviesa la membrana interna por el transportador de malato-α-cetoglutarato. ❸ En la matriz el malato pasa dos equivalentes de reducción al NAD^+; el NADH resultante es oxidado por la cadena respiratoria; ❹ el oxalacetato formado a partir del malato no puede pasar directamente al citosol. ❺ El oxalacetato se transporta primero a aspartato que puede salir vía el transportador de glutamato-aspartato. ❻ En el citosol se regenera el oxalacetato con lo que completa el ciclo y el glutamato producido en la misma reacción entra en la matriz mediante el transportador de glutamato-aspartato.

COPY STATION

■ La energía conservada en un gradiente de protones puede impulsar el transporte de solutos contra gradiente a través de una membrana.



■ La membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH y al NAD^+, pero se transportan equivalentes de NADH desde el citosol a la matriz por una de dos lanzaderas. Los equivalentes de NADH que se transportan mediante la lanzadera del malato-aspartato entran en la cadena respiratoria por el Complejo I dando una razón P/O de 2,5; los que se transportan por la lanzadera del glicerol 3-fosfato entran por la ubiquinona y dan una razón P/O de 1,5

19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa sintetiza la mayor parte del ATP que se produce en las células aeróbicas. La oxida-

FIGURA 19-32 Lanzadera del glicerol-3-fosfato. Este medio alternativo para transportar equivalentes de reducción desde el citosol a la cadena respiratoria actúa en músculo esquelético y en cerebro. En el citosol, la dihidroxiacetona fosfato acepta dos equivalentes de reducción del NADH en una reacción catalizada por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica. Un isozima de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa unido a la cara exterior de la membrana interna transfiere dos equivalentes de reducción desde el glicerol-3-fosfato del espacio intermembrana a la ubiquinona. Observe que esta lanzadera no necesita sistemas de transporte de membranas.

ción completa de una molécula de glucosa a CO_2 da lugar a la formación de 30 ó 32 ATP (Tabla 19-5). En comparación, la glucólisis en condiciones anaeróbicas (fermentación láctica) genera sólo dos ATP por glucosa. Resulta evidente que la evolución de la fosforilación oxidativa originó un enorme incremento en la eficiencia energética del catabolismo. La oxidación completa a CO_2 del derivado del coenzima A y del palmitato (16:0), que también se da en la matriz mitocondrial, da un rendimiento de 108 ATP por palmitil-CoA (véase la Tabla 17-1). Se puede realizar un cálculo similar del rendimiento en ATP para la oxidación de cada uno de los aminoácidos (Capítulo 18). Las vías oxidativas aeróbicas que acaban en la transferencia de electrones al O_2 junto a la fosforilación oxidativa son las responsables de la mayor parte del ATP que se produce en el catabolismo. Por lo tanto, es absolutamente esencial que se regule la producción de ATP en la fosforilación oxidativa para adaptarse a las necesidades fluctuantes de ATP de la célula.

La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades celulares de energía

La tasa respiratoria (consumo de O_2) en la mitocondria está bajo una regulación precisa; está limitada generalmente por la disponibilidad de ADP como sustrato de la fosforilación. La dependencia de la velocidad de consumo de O_2 con la concentración de ADP, el aceptor del P_i (Fig. 19.20b), denominada **control por aceptor** de la respiración, puede ser espectacular. En algunos tejidos animales la **razón del control por aceptor**, la proporción de la velocidad máxima de consumo de O_2 inducida por el ADP a la velocidad basal en ausencia de ADP, es al menos de 10.

La concentración intracelular de ADP es una medida del estatus energético de la célula. Otra medida relacionada con ella es la **razón de la acción de masas** del sistema ATP-ADP: [ATP]/([ADP][P_i]). Normalmente este cociente es muy elevado de modo que el sistema ATP-ADP está casi completamente fosforilado. Cuando aumenta la velocidad de algunos procesos que requieren energía (síntesis de proteínas, por ejemplo), se produce un aumento en la velocidad de degradación del ATP a ADP y P_i disminuyendo la razón de la acción de masas. Con más ADP disponible para la fosforilación oxidativa aumenta la velocidad de la respiración, lo que da lugar a la regeneración de ATP. Ésta continúa hasta que la razón de acción de masas vuelve a su valor elevado normal, punto en el que la respiración vuelve a hacerse más lenta. La velocidad de oxidación de los combustibles celulares está regulada con tal sensibilidad y precisión que la razón [ATP]/([ADP][P_i]) fluctúa sólo ligeramente en la mayoría de tejidos, incluso durante variaciones extremas en la demanda de energía. En pocas palabras, el ATP se forma a la misma velocidad en que es requerido por las actividades celulares.

Una proteína inhibidora impide la hidrólisis de ATP durante la hipoxia

Ya hemos encontrado la ATP sintasa como una bomba de protones impulsada por ATP (véase la Fig. 11-37) catalizando el inverso de la síntesis de ATP. Cuando una célula está hipóxica (privada de oxígeno), tal como sucede en un infarto de miocardio o un ictus, see hace más lenta la transferencia de electrones al oxígeno y lo mismo sucede con el bombeo de protones. La fuerza protón-motriz desaparece al poco rato. En estas condiciones la ATP sintasa podría operar en sentido inverso, hidrolizando ATP producido por la glucólisis para bombear protones hacia el exterior y causando una disminución desastrosa en los niveles de ATP. Esto no se produce gracias a un inhibidor proteico pequeño (84 aminoácidos), IF_1, que se une simultáneamente a dos moléculas de ATP sintasa inhibiendo su actividad ATPasa **(Fig. 19-33)**. IF_1 sólo es inhibidora en su forma dimérica, que está favorecida a un pH inferior a 6,5. En una célula sin oxígeno, la principal fuente de ATP es la glucólisis con lo que los ácidos pirúvico o láctico así formados disminuyen el pH en el citosol y la matriz mitocondrial. Esto favorece la dimerización de IF_1 que lleva a la inhibición de la actividad ATPasa de la ATP sintasa, impidiendo de este modo la hidrólisis despilfarradora de ATP. Cuando se reanuda el metabolismo aeróbico se hace más lenta la formación de pirúvico, el pH del citosol aumenta, se desestabiliza el dímero de IF_1 y desaparece la inhibición de la ATP sintasa. IF_1 es una proteína intrínsecamente desordenada; sólo adquiere su conformación favorecida cuando interacciona con la ATP sintasa.

La hipoxia conduce a la producción de ROS y varias respuestas de adaptación

En las células hipóxicas se produce un desequilibrio entre la entrada de electrones procedentes de la oxida-

TABLA 19-5 Rendimiento de ATP en la oxidación completa de la glucosa

Proceso	Producto directo	ATP finales
Glucólisis	2 NADH (citosólico)	3 o 5[a]
	2 ATP	2
Oxidación del piruvato (dos por glucosa)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidación del acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico (dos por glucosa)	6 NADH (matriz mitocondrial)	15
	2 $FADH_2$	3
	2 ATP o 2 GTP	2
Rendimiento total por glucosa		30 o 32

[a]Si se utiliza la lanzadera malato/aspartato para transferir equivalentes de reducción a la mitocondria, el rendimiento es 5 ATP. Si se utiliza la lanzadera del glicerol 3-fosfato, el rendimiento es 3 ATP.

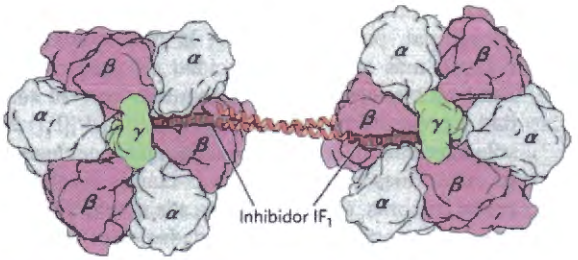


FIGURA 19-33 Estructura de la F1-ATPasa bovina en un complejo con su proteína reguladora IF_1. Se ven aquí dos moléculas de F_1 desde el lado P al igual que en la Figura 19-25c. El inhibidor IF_1 (rojo) se une a la interfase $\alpha\beta$ de las subunidades en la conformación difosfato (ADP) (α-ADP y β-ADP), congelando los dos complejos F_1 y, por tanto, bloqueando la hidrólisis del ATP (y la síntesis). (Partes de IF_1 que no se pudieron resolver en los cristales de F_1 se muestran (rojo claro) tal como aparecen en cristales de IF_1 aislado). Este complejo sólo es estable al bajo pH citosólico característico de las células que están produciendo ATP por glucólisis; cuando se reanuda el metabolismo aeróbico, el pH citosólico aumenta, se desestabiliza el inhibidor y se activa la ATP sintasa [Fuente: De PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003.]

ción de combustibles en la matriz mitocondrial y la transferencia de electrones al oxígeno molecular lo que da lugar a un incremento en la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS). Además del sistema de la glutatión peroxidasa (Fig. 19-18), las células tienen otras dos líneas de defensa contra las ROS **(Fig. 19-34)**. Una es la regulación de la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que aporta acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico (Capítulo 16). En condiciones hipóxicas, la PDH quinasa fosforila la PDH mitocondrial inactivándola y disminuyendo el suministro de $FADH_2$ y NADH del ciclo del ácido cítrico a la cadena respiratoria. Una segunda forma de impedir la formación de ROS es el reemplazo de una subunidad del Complejo IV, conocida como COX4-1 por otra subunidad, COX4-2, que está mejor adaptada a las condiciones hipóxicas. Con COX4-1, las propiedades catalíticas del Complejo IV son óptimas para la respiración con concentraciones normales de oxígeno; con COX4-2, se optimiza el Complejo IV para operar en condiciones hipóxicas.

Los cambios en la actividad PDH y en el contenido de COX4-2 del Complejo IV están promovidos por HIF-1, el factor inducible por la hipoxia. HIF-1 (otra proteína intrínsecamente desordenada) se acumula en las células hipóxicas y, actuando como factor de transcripción, desencadena un aumento en la síntesis de PDH quinasa, COX4-2 y una proteasa que degrada COX4-1. HIF-1 es un regulador general de la homeostasis del O_2. Recuerde que también interviene en loscambios en el transporte de glucosa y en los enzimas glucolíticos que producen el efecto Warburg, la dependencia de la glucólisis (no de la respiración mitocondrial) para la producción de ATP, incluso en presencia de oxígeno suficiente (véase el Recuadro 14-1).

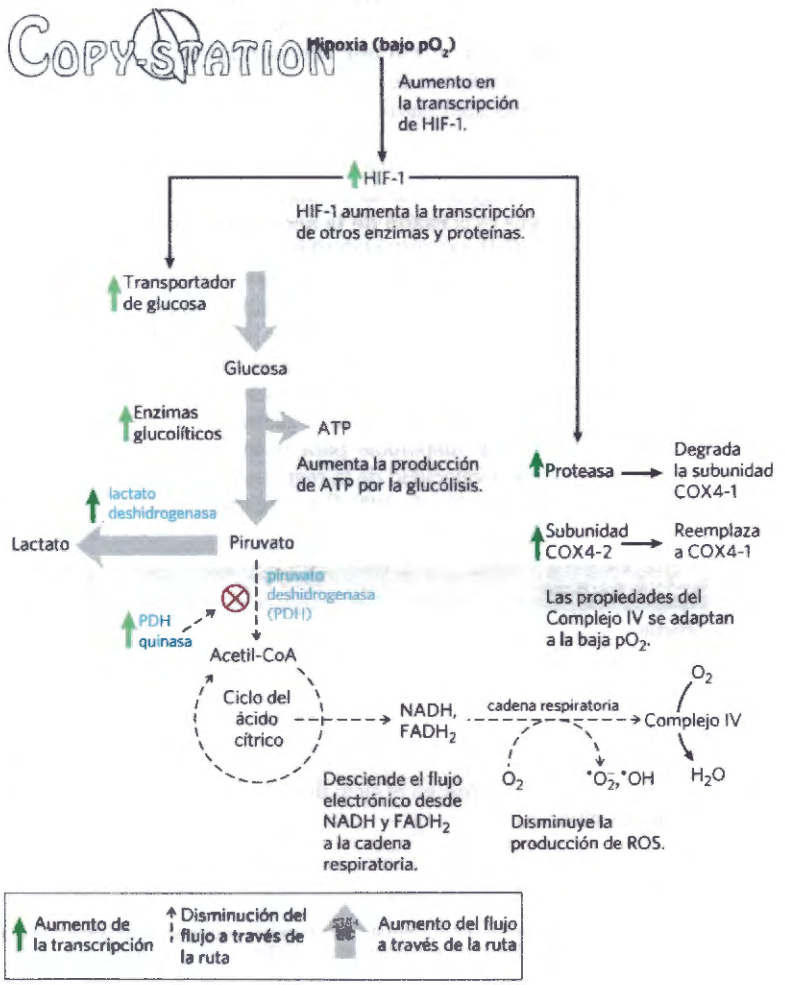


FIGURA 19-34 El factor inducible por la hipoxia (HIF-1) regula la expresión génica para reducir la formación de ROS. En condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia), se sintetiza HIF-1 en mayor cantidad y actúa como factor de transcripción que incrementa la síntesis del transportador de glucosa, enzimas glucolíticos, piruvato deshidrogenasa quinasa (PDH quinasa), lactato deshidrogenasa, una proteasa que degrada la subunidad COX4-1 de la citocromo oxidasa y la subunidad COX4-2 de la citocromo oxidasa. Estos cambios contrarrestan la formación de ROS al disminuir el suministro de NADH y $FADH_2$ y hacer que la citocromo oxidasa del Complejo IV sea más efectiva. [Fuente: Información de D. A Harris *Bioenergetics at a Glance* p. 36, Blackwell Science, 1995.]

Cuando estos mecanismos para contrarrestar las ROS son insuficientes, debido a mutación genética que afecta una de las proteínas protectoras o en condiciones de muy elevada producción de ROS, la función mitocondrial está en peligro. Se cree que las lesiones mitocondriales intervienen en el envejecimiento, fallo cardíaco, ciertos casos raros de diabetes (descritos más adelante) y varias enfermedades genéticas heredadas por vía materna que afectan al sistema nervioso. ■

Las rutas de formación de ATP están reguladas de forma coordinada

Las principales rutas catabólicas tienen mecanismos reguladores solapados y concertados que les permiten funcionar conjuntamente en una forma económica y autorreguladora para la producción de ATP y precursores biosintéticos. Las concentraciones relativas de ATP y ADP controlan no sólo las velocidades de transferencia electrónica y fosforilación oxidativa sino también las velocidades del ciclo del ácido cítrico, oxidación del piruvato y glucólisis **(Fig. 19-35)**. Donde quiera que haya un incremento en el consumo de ATP aumenta la velocidad de transferencia electrónica y de fosforilación oxidativa. Simultáneamente, aumenta la velocidad de oxidación del piruvato vía ciclo del ácido cítrico, con lo que aumenta el flujo de electrones hacia la cadena respiratoria. Estos procesos pueden, a su vez, provocar un aumento en la velocidad de glucólisis aumentando la velocidad de formación del piruvato. Cuando la conversión del ADP a ATP disminuye la concentración de ADP, el control por aceptor hace más lenta la transferencia de electrones y con ello la fosforilación oxidativa. La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico también disminuyen su velocidad porque el ATP es un inhibidor alostérico del enzima glucolítico fosfofructoquinasa-1 (véase la Fig. 15-16) y de la piruvato deshidrogenasa (véase la Fig. 16-19).

La fosfofructoquinasa-1 es también inhibida por el citrato que es el primer intermediario del ciclo del ácido cítrico. Cuando el ciclo está "en reposo" el citrato se acumula en la mitocondria y a continuación se transporta al citosol. Cuando se elevan las concentraciones citosólicas de ATP y citrato se produce una inhibición alostérica concertada de la fosfofructoquinasa-1 que es mayor que la suma de sus efectos individuales, disminuyendo la velocidad de la glucólisis.

RESUMEN 19.3 Regulación de la fosforilación oxidativa

- La fosforilación oxidativa está regulada por las necesidades energéticas celulares. La [ADP] intracelular y la razón de acción de masas [ATP]/([ADP][P_i]) son indicadores del estatus energético de la célula.
- En células hipóxicas (privadas de oxígeno), un inhibidor proteico bloquea la hidrólisis de ATP por la ATP sintasa operando en sentido inverso, impidiendo así una caída drástica en la [ATP].
- Las respuestas de adaptación a la hipoxia, a través de HIF-1, hacen más lenta la transferencia de electrones a la cadena respiratoria y modifican el Complejo IV para que actúe de manera más eficiente en condiciones de baja concentración de oxígeno.

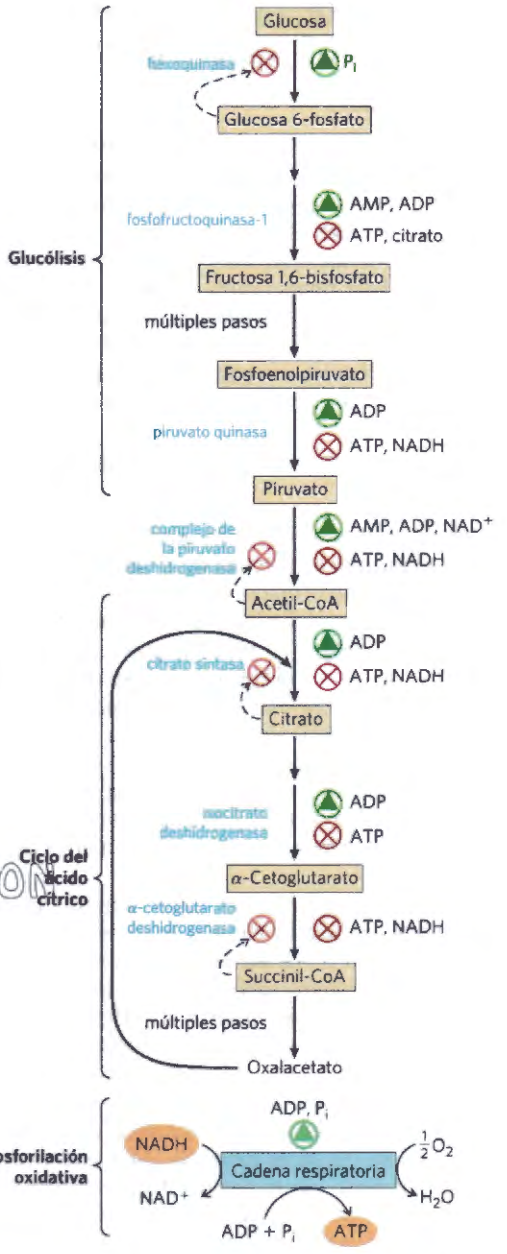


FIGURA 19-35 Regulación de las vías productoras de ATP. Este diagrama muestra la regulación coordinada de la glucólisis, oxidación del piruvato, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa por las concentraciones relativas de ATP, ADP y AMP y por NADH. Alta [ATP] (o baja [ADP] y [AMP]) disminuyen la velocidad de glucólisis, oxidación del piruvato, oxidación del acetato vía ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa. Las cuatro rutas están aceleradas cuando hay un aumento en la velocidad de utilización del ATP con un incremento en la formación de ADP, AMP y P_i. La capacidad del citrato de inhibir tanto la glucólisis como el ciclo del ácido cítrico refuerza la acción del sistema de los nucleótidos de adenina. Además, el aumento de [NADH] y [acetil-CoA] también inhiben la oxidación del piruvato a acetil-CoA y razones [NADH]/[NAD+] elevadas inhiben las reacciones de las deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 16-19).

■ Las concentraciones de ATP y ADP marcan la velocidad de transferencia electrónica a través de la cadena respiratoria, vía una serie de controles entrelazados sobre la respiración, glucólisis y ciclo del ácido cítrico.

19.4 Las mitocondrias en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis

Aunque la producción de ATP es una función central de las mitocondrias, estos orgánulos tienen otras funciones que, en tejidos específicos o en determinadas circunstancias , también son cruciales. En el tejido adiposo, las mitocondrias generan calor para proteger órganos vitales de la baja temperatura ambiente; en las glándulas suprarrenales y en las gónadas, las mitocondrias son el sitio de la síntesis de hormonas esteroideas y en la mayoría de tejidos son participantes clave en la apoptosis (muerte celular programada).

Las mitocondrias desacopladas del tejido adiposo marrón producen calor

Hemos visto anteriormente que la respiración se hace más lenta cuando la célula tiene un suministro adecuado de ATP. Existe una excepción notable e instructiva a esta regla general. En la mayoría de mamíferos, incluido el hombre, los recién nacidos tienen un tipo de tejido adiposo denominado **tejido adiposo marrón** (**BAT**; p. 923) en el que la oxidación de combustibles no sirve para producir ATP sino para generar calor y mantener caliente al recién nacido. Este tejido adiposo especializado es marrón debido a la presencia de grandes cantidades de mitocondrias y, por consiguiente, de citocromos cuyos grupos hemo absorben fuertemente la luz visible.

Las mitocondrias del tejido adiposo marrón son igual que las demás mitocondrias de otras células de mamíferos en todos los aspectos, a excepción de que tienen una proteína particular en su membrana interna. La **proteína desacoplante 1 (UCP1)** proporciona una vía para que los protones vuelvan a la matriz sin pasar por el complejo F_0F_1 **(Fig. 19-36)**. El resultado de este cortocircuito de protones es que la energía de oxidación no se conserva mediante la formación de ATP sino que se disipa en forma de calor que contribuye al mantenimiento de la temperatura corporal (véase la Fig. 23-16). Los animales hibernantes también dependen de las mitocondrias desacopladas del BAT para generar calor durante sus largos períodos de letargo (véase el Recuadro 17-1). Volveremos al papel de la UCP1 cuando discutamos la regulación de la masa corporal en el Capítulo 23 (pp. 940-941).

Las monooxigenasas P-450 mitocondriales catalizan las hidroxilaciones de esteroides

La mitocondria es el sitio de reacciones biosintéticas que producen hormonas esteroideas, entre ellas las hormonas sexuales, glucocorticoides, mineralocorticoides y hormona de la vitamina D. Estos compuestos se sintetizan a partir del colesterol o un esterol relacionado en una serie de hidroxilaciones catalizadas por enzimas de la familia del **citocromo P-450** (véase el Recuadro 21-1) que poseen todos ellos un grupo hemo crítico (su absorción a 450 nm da el nombre a esta familia). En las reacciones de hidroxilación, se incorpora un átomo del oxígeno molecular al sustrato mientras que el segundo

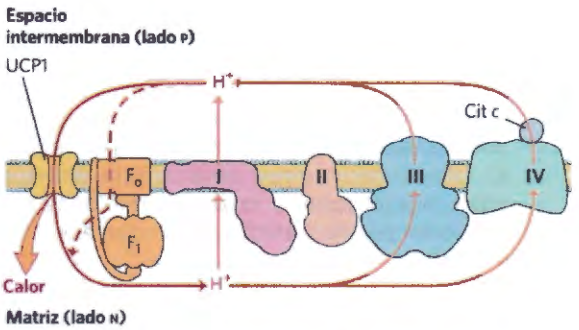


FIGURA 19-36 Generación de calor por mitocondrias desacopladas. La proteína desacoplante de las mitocondrias del tejido adiposo marrón al proporcionar una ruta alternativa para que los protones vuelvan a entrar en la matriz mitocondrial, hace que la energía conservada por el bombeo de protones se disipe en forma de calor.

átomo se reduce a H_2O, lo que hace que los citocromos P450 sean enzimas monooxigenasas:

$$R{-}H + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow R{-}OH + H_2O + NADP^+$$

En esta reacción se oxidan dos especies: NADPH y R—H.

Existen docenas de enzimas P-450, situados todos ellos en la membrana mitocondrial interna con su sitio catalítico expuesto a la matriz. Las células esteroidogénicas están rellenas de mitocondrias especializadas en la síntesis de esteroides; las mitocondrias son generalmente mayores que las de otros tejidos y tienen membranas internas más extensas y replegadas **(Fig. 19-37)**.

La ruta del flujo electrónico en el sistema P-450 mitocondrial es complejo y en él intervienen una flavoproteína y una proteína ferro-sulfurada que trasporta electrones desde el NADPH al hemo del P-450 **(Fig. 19-38)**. Todos los enzimas P-450 tienen un grupo hemo, que interacciona con el O_2 y un sitio de unión de sustrato que le confiere especificidad.

En el retículo endoplasmático de los hepatocitos se encuentra otra gran familia de enzimas P-450. Estos enzimas catalizan reacciones similares a las reacciones de los P-450 mitocondriales, pero entre sus sustratos se incluye una gran variedad de compuestos hidrofóbicos, muchos de los cuales son **xenobióticos**, compuestos que no se encuentran en la naturaleza pero que se sintetizan industrialmente. Los enzimas P-450 del RE tienen especificidades de sustrato muy amplias y solapadas. La hidroxilación de los compuestos hidrofóbicos los hace más hidrosolubles con lo que pueden ser eliminados por los riñones y excretados en la orina. Entre los sustratos de estas P-450 oxigenasas se encuentran muchos medicamentos comunes. El metabolismo por parte de los enzimas P-450 limita el tiempo de vida del medicamento en el torrente circulatorio y sus efectos terapéuticos. Los humanos difieren en su dotación genética de enzimas P-450 en el RE y en la extensión en la que se han inducido ciertos enzimas P-450, como por ejemplo debido a una historia de consumo de alcohol. En principio, por tanto, la genética y la historia personal de un individuo podrían figurar en la determinación de la dosis terapéutica de un medicamento; en la práctica esta adaptación precisa de la

COPY-STATION

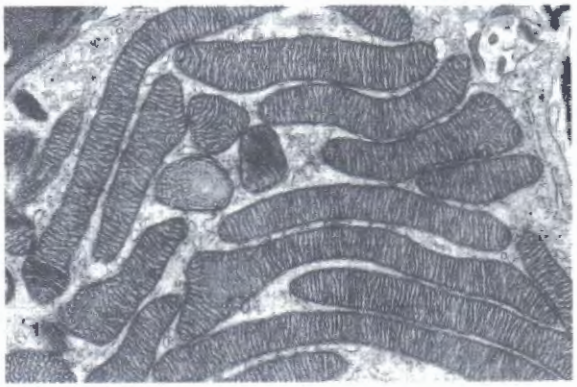


FIGURA 19-37 Mitocondrias de la glándula suprarrenal, especializadas en la síntesis de esteroides. Tal como se ven en esta micrografía eletrónica de una sección fina de la glándula suprarrenal, las mitocondrias son abundantes y tienen crestas abundantes lo que proporciona una gran superficie para los enzimas P-450 de la membrana interna. [Fuente: Don Fawcett/Science Source.]

dosificación no es aún factible económicamente, si bien podría llegar a serlo. ■

Las mitocondrias son de importancia crucial en el inicio de la apoptosis

La **apoptosis**, también llamada **muerte celular programada**, es un proceso mediante el que células individuales mueren por el bien del organismo por ejemplo, en el transcurso de un desarrollo embrionario normal, al tiempo que el organismo conserva los componentes moleculares de la célula (aminoácidos, nucleótidos, etc.). La apoptosis pede ser provocada por una señal externa que actúa sobre un receptor de la membrana plasmática o mediante procesos internos tales como lesiones en el DNA, una infección vírica, estrés oxidativo por la acumulación de ROS u otro estrés tal como el choque térmico.

Las mitocondrias juegan un papel crucial en el desecadenamiento de la apoptosis. Cuando un agente estresante da la señal para la muerte celular, una consecuencia temprana es un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que permite la salida del citocromo *c* del espacio intermembrana al citosol **(Fig. 19-39)**. El aumento de la permeabilidad se debe a la apertura del **complejo del poro de transición de la permeabilidad (PTPC)**, una proteína con múltiples subunidades de la membrana externa; su apertura y cierre están afectados por varias proteínas que estimulan o suprimen la apoptosis. Cuando se libera al citosol, el citocromo *c* interacciona con monómeros de la proteína **Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa de la apoptosis)**, lo que lleva a la formación de un **apoptosoma** compuesto por siete moléculas de Apaf-1 y siete moléculas de citocromo *c*. El apoptosoma proporciona la plataforma sobre la que el proenzima procaspasa-9 se activa a caspasa-9, un miembro de una familia de proteasas muy específicas, las **caspasas**, implicadas en la apoptosis. Estas proteasas comparten un residuo *Cys* crítico en su sitio activo y todas cortan proteínas sólo en el lado carboxilo terminal de residuos *Asp*, de ahí el nombre de "caspasas". La caspasa-9 inicia una cascada de activaciones proteolíticas, con una caspasa activando una segunda caspasa y ésta, a su vez, activando una tercera y así sucesivamente (véase la Fig. 12-40). (Esta función del citocromo *c* en la apoptosis es un caso claro de segunda actividad "tenue", "moonlighting", en la que una proteína tiene dos funciones diferentes en la célula; véase el Recuadro 16-1).

RESUMEN 19.4 Papel de la mitocondria en la termogénesis, síntesis de esteroides y apoptosis

- En el tejido adiposo marrón de los recién nacidos, la transferencia de electrones está desacoplada de la síntesis de ATP por lo que la energía de la oxidación de los combustibles se disipa en forma de calor. Los animales que hibernan utilizan esta estrategia para evitar la congelación
- Los pasos de reacciones de hidroxilación en la síntesis de las hormonas esteroideas en los tejidos esteroidogénicos (glándula suprarrenal, gónadas, hígado y riñón) tienen lugar en mitocondrias especializadas.
- El citocromo *c* mitocondrial, liberado al citosol, participa en la activación de la caspasa-9, una las proteasas que intervienen en la apoptosis.

19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de las mutaciones

Las mitocondrias tienen su propio genoma, una molécula circular de DNA de doble cadena (mtDNA). Cada una de las cientos o miles de mitocondrias de una célula típica tiene unas cinco copias de este genoma. Hay 37 genes (16.569 pb) en el cromosoma mitocondrial humano **(Fig. 19-40)** incluidos 13 que codifican subunidades de proteí-

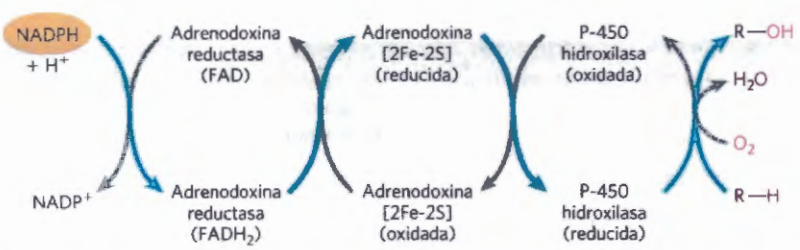


FIGURA 19-38 Ruta del flujo de electrones en las reacciones del citocromo P-450 mitocondrial de la glándula suprarrenal. Se transfieren dos electrones desde el NADPH a la adrenodoxina reductasa, una flavoproteína que contiene FAD, la cual pasa los electrones, de uno en uno,a la adrenodoxina, una pequeña proteína 2Fe-2S soluble. La adrenodoxina pasa electrones individuales a la citocromo P-450 hidroxilasa, que interacciona directamente con el O_2 y el sustrato (R-H) formando los productos H_2O y R-OH.

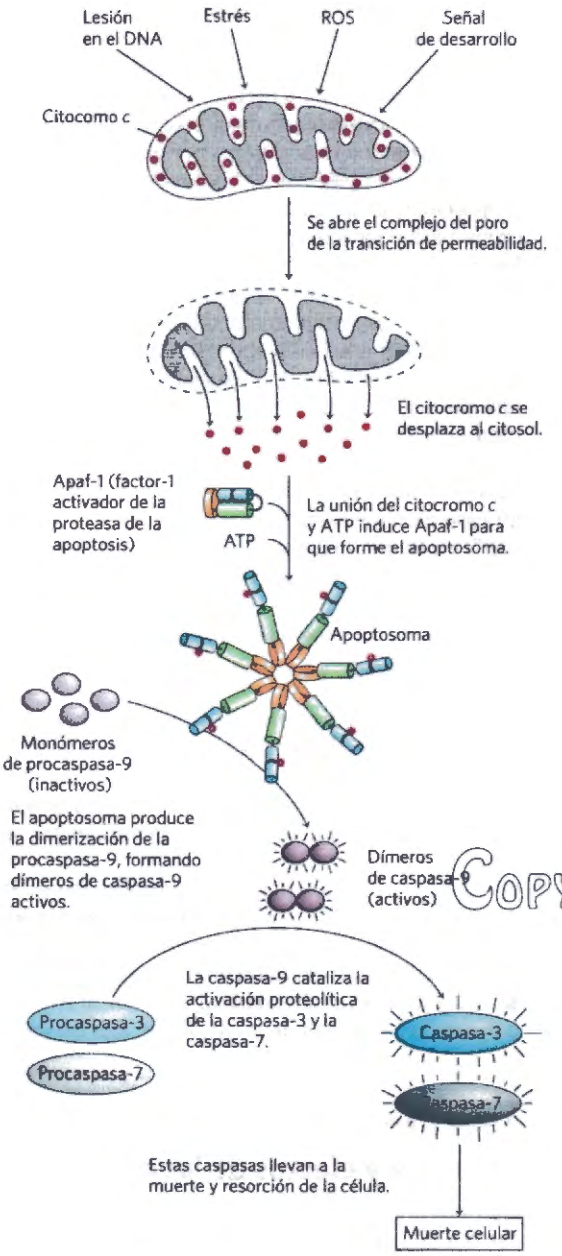


FIGURA 19-39 Papel del citocromo *c* en la apoptosis. El citocromo *c* es una pequeña proteína mitocondrial soluble, localizada en el espacio intermembrana, que transporta electrones entre los Complejos III y IV durante la respiración. En un papel totalmente diferente, tal como se describe aquí, actúa como desencadenante de la apoptosis al estimular la activación de una familia de proteasas denominadas caspasas. [Fuente: Información de S. J. Riedl y G. S. Salvesen, *Nature Rev.Mol. Cell Biol.* 8:409, 2007, Fig. 3.]

nas de la cadena respiratoria (Tabla 19-6); los restantes genes codifican moléculas de rRNA y tRNA esenciales para la maquinaria sintetizadora de proteínas de la mitocondria. Para sintetizar estas 13 subunidades proteicas, las mitocondrias tienen sus propios ribosomas, claramente diferentes de los del citoplasma. La gran mayoría de proteínas mitocondriales, unos 1.100 tipos diferentes, están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos y seguidamente se importan y organizan dentro de la mitocondria (Capítulo 27).

Las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas

La existencia del DNA mitocondrial, ribosomas y tRNA apoya la hipótesis sobre el origen endosimbiótico de las mitocondrias (véase la Fig. 1-40) que supone que los primeros organismos capaces de metabolismo aeróbico, incluida la producción de ATP ligada a la respiración, eran bacterias. Los eucariotas primitivos que vivían anaeróbicamente (por fermentación) adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa cuando establecieron una relación simbiótica con bacterias que vivían en su citosol. Tras un larg período de evolución y traslado de muchos genes bacterianos al núcleo del eucariota "huésped", las bacterias endosimbióticas se transformaron finalmente en mitocondrias.

Esta hipótesis supone que bacterias primitivas que vivían libremente tenían la maquinaria enzimática para la fosforilación oxidativa. Además, predice que sus descendientes bacterianos modernos han de tener cadenas respiratorias muy similares a las de los eucariotas modernos. Ello es así. Las bacterias aeróbicas llevan a cabo la transferencia de electrones ligada a NAD desde sustratos al O_2 acoplada a la fosforilación del ADP citosólico. Las deshidrogenasas están localizadas en el citosol bacteriano, y la cadena respiratoria en la membrana plasmática. Los transportadores electrónicos translocan protones al exterior a través de la membrana plasmática al tiempo que transfieren electrones al O_2. Bacterias tales como *E. coli* tienen complejos F_oF_1 en sus membranas plasmáticas; la porción F_1 sobresale en el citosol y cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a medida que los protones fluyen de nuevo hacia el interior de la célula a través del canal protónico de F_o.

COPY-STATION

TABLA 19-6 Proteínas respiratorias codificadas en el cromosoma mitocondrial humano

Complejo	Número de subunidades	Número de subunidades codificadas en el DNA mitocondrial
I NADH deshidrogenasa	45	7
II Succinato deshidrogenasa	4	0
III Ubiquinona-citocromo *c* oxidorreductasa	11	1
IV Citocromo oxidasa	13	3
V ATP sintasa	8	2

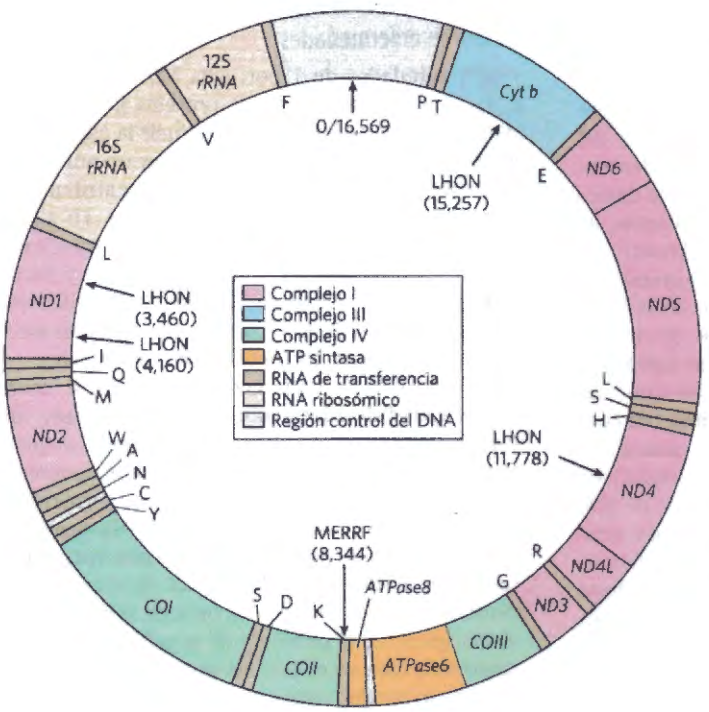


FIGURA 19-40 Genes mitocondriales y mutaciones. **(a)** Mapa del DNA mitocondrial humano en el que se muestran los genes que codifican proteínas del Complejo I, la NADH deshidrogenasa (*ND1* a *ND6*); el citocromo *b* del Complejo III (*cyt b*); las subunidades de la citocromo oxidasa (Complejo IV) (*COI* a *COIII*); y dos subunidades de la ATP sintasa (*ATPase6* y *ATPase8*). Los colores de los genes corresponden a los colores de los complejos mostrados en la Fig. 19-7. También se muestran aquí los genes de los RNA ribosómicos (*rRNA*) y de una serie de RNA de transferencia específicos de la mitocondria; la especificidad de los tRNA está indicada mediante el código de una letra para los aminoácidos. Las flechas indican las posiciones de mutaciones que provocan la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y la epilepsia mioclónica y la enfermedad de las fibras rojas rasgadas (MERRF). Los números en paréntesis indican la posición de los nucleótidos alterados (el nucleótido número 1 está en la parte superior del círculo y la numeración transcurre en sentido antihorario). [Fuente: Información de M. A. Morris. *J. Clin. Neuroophthalmol.* 10:159, 1990.]

La salida de protones ligada a la respiración a través de la membrana plasmática bacteriana también suministra la fuerza motora para otros procesos. Ciertos sistemas de transporte bacterianos llevan a cabo la captación de nutrientes extracelulares (lactosa, por ejemplo) contra un gradiente de concentración en co-transporte paralelo con protones (véase la Fig. 11-39). Y el movimiento rotacional de los flagelos bacterianos lo proporcionan "turbinas de protones", motores rotatorios moleculares impulsados no por el ATP sino directamente por el potencial electroquímico transmembrana generado por el bombeo protónico ligado a la respiración **(Fig. 19-41)**. Parece probable que los mecanismos quimiosmóticos aparecieron pronto, antes de la aparición de los eucariotas.

En el DNA mitocondrial se acumulan mutaciones a lo largo de la vida del organismo

La cadena respiratoria es el principal productor de especies de oxígeno reactivas en las células por lo que el contenido mitocondrial, incluido el genoma mitocondrial, está sujeto a la máxima exposición, y a las lesiones, por ROS. Además, el sistema de replicación del DNA mitocondrial es menos efectivo que el sistema nuclear en la corrección de errores producidos durante la replicación así como en la reparación de las lesiones del DNA. En consecuencia, los defectos en el mtDNA se acumulan a lo largo del tiempo. Una teoría sobre el envejecimiento es que esta acumulación gradual de defectos es la causa principal de muchos de los "síntomas" del envejecimiento entre los que se cuentan, por ejemplo, una debilitación progresiva de los músculos esquelético y cardíaco.

Una característica exclusiva de la herencia mitocondrial es la variación entre células individuales, y entre un organismo individual y otro, en los efectos de una mutación en el mtDNA. Una célula típica tiene cientos o millares de mitocondrias, cada una con múltiples copias de su propio genoma (Fig. 19-2b). Los animales heredan esencialmente todas sus mitocondrias del progenitor hembra. Los huevos son grandes y contienen entre 10^5 y 10^6 mitocondrias mientras que los espermatozoides son mucho más pequeños y contienen muchas menos mitocondrias, del orden de 100 a 1.000. Además, existe un mecanismo activo para marcar las mitocondrias procedentes de los espermatozoides para su degradación en el huevo fertilizado. Inmediatamente después de la fertilización, los fagosomas maternos migran hacia el sitio de entrada del espermatozoide, rodean las mitocondrias masculinas y las degradan.

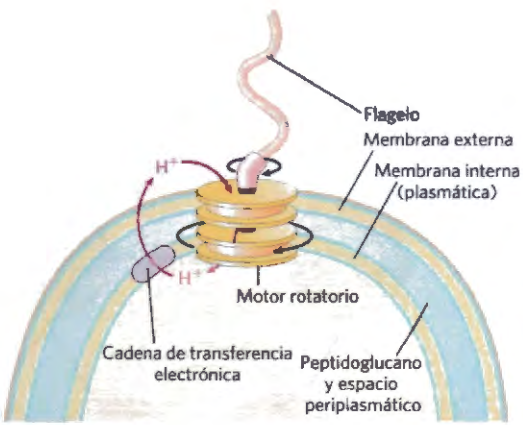


FIGURA 19-41 Rotación de los flagelos bacterianos por la fuerza protón-motriz. El eje y anillos de la base del flagelo constituyen un motor rotatorio que se ha denominado una «turbina de protones». Los protones lanzados al exterior por la transferencia electrónica fluyen de nuevo a la célula a través de la turbina haciendo que gire el eje del flagelo. Este movimiento difiere fundamentalmente del movimiento del músculo y del de los flagelos y cilios eucarióticos en los que la hidrólisis de ATP es la fuente de energía.

Suponga que en un organismo hembra, se produce una lesión en un genoma mitocondrial de una célula germinal de la que se desarrollan oocitos, de modo que la célula germinal contiene principalmente mitocondrias de tipo silvestre pero también hay una mitocondria con un gen mutante. Durante la maduración del oocito, a medida que esta célula germinal y sus descendientes se dividen repetidamente, la mitocondria defectuosa se replica y su progenie, todas defectuosas, se distribuyen al azar en las células hijas. Finalmente, las células huevo maduras contienen diferentes proporciones de la mitocondria defectuosa. Cuando se fertiliza una célula huevo y experimenta la multitud de divisiones del desarrollo embrionario, las células somáticas resultantes difieren en su proporción de mitocondrias mutantes **(Fig. 19-42a)**. Esta **heteroplasmia** (en contraposición con la **homoplasmia**, en la que cada genoma mitocondrial es el mismo en todas las células) da lugar a fenotipos mutantes con diversos grados de gravedad. Las células (y tejidos) que contienen mayoritariamente mitocondrias de tipo silvestre tienen el fenotipo silvestre; son esencialmente normales. Otras células heteroplásmicas tendrán fenotipos intermedios, algunos casi normales, otros anormales (con una elevada proporción de mitocondrias mutantes) (Fig. 19-42b). Si el fenotipo anormal está asociado con una enfermedad (véase más adelante), los individuos con la misma mutación del mtDNA pueden tener síntomas de gravedad diferente, según el número y distribución de las mitocondrias afectadas.

Algunas mutaciones en los genomas mitocondriales producen enfermedades

Alrededor de 1 por cada 5.000 personas tienen una mutación en una proteína mitocondrial que da lugar a una enfermedad al reducir la capacidad de la célula para generar ATP. Cada vez hay un número mayor de estas enfermedades que se pueden atribuir a mutaciones de los genes mitocondriales **(Fig. 19-43)**. Algunos tejidos y tipos celulares (neuronas, miocitos tanto del músculo esquelético como del cardíaco y las células β del páncreas) toleran menos que otras la disminución en la producción de ATP por lo que se ven más afectadas por mutaciones de las proteínas mitocondriales.

Un grupo de enfermedades genéticas, conocidas como **encefalomiopatías mitocondriales,** afectan principalmente al cerebro y al músculo esquelético. Estas enfermedades se heredan invariablemente de la madre ya que, tal como se ha dicho anteriormente, todas las mitocondrias del embrión en desarrollo provienen del huevo. La rara enfermedad **neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)** afecta al sistema nervioso central, incluidos los nervios ópticos, con pérdida de la visión bilateral, al principio de la adolescencia. Un solo cambio de base en el gen mitocondrial *ND4* (Fig. 19-40) cambia un residuo Arg por un residuo His en un polipéptido del Complejo I siendo el resultado que las mitocondrias son parcialmente defectuosas en la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona. Aunque estas mitocondrias son capaces de producir algo de ATP por transferencia de electrones desde el succinato, aparentemente no pueden suministrar ATP en cantidad suficiente para mantener el metabolismo neuronal, incluido el nervio óptico, que es muy activo. Un solo cambio de base en el gen mitocondrial del citocromo *b*,

Copy-Station

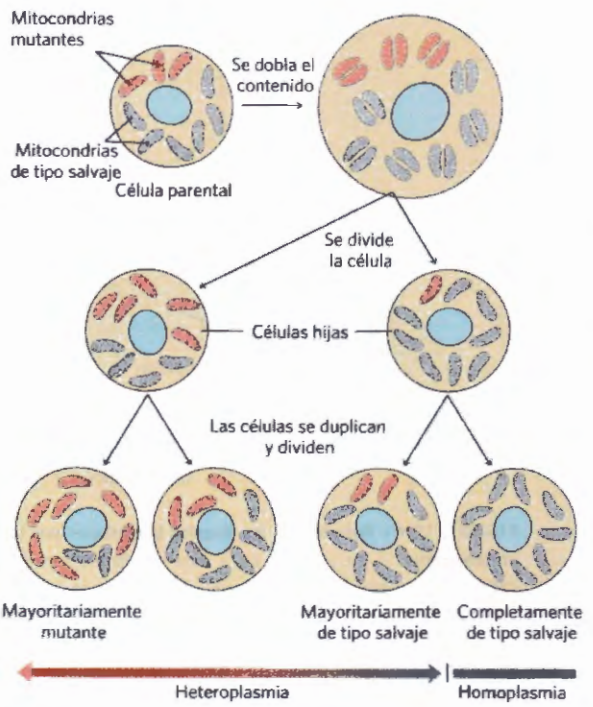
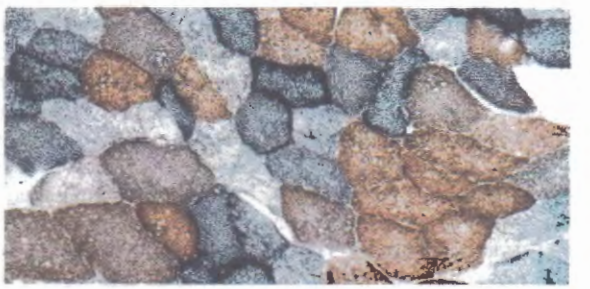


FIGURA 19-42 Heteroplasmia en los genomas mitocondriales. (a) Cuando se fertiliza una célula huevo madura, todas las mitocondrias de la célula diploide resultante (zigoto) son de origen materno; nunca proceden del esperma. Si una parte de las mitocondrias maternas tienen un gen mutante, la distribución al azar de las mitocondrias durante las divisiones celulares posteriores producen algunas células hijas que contienen mayoritariamente mitocondrias mutantes, algunas con mitocondrias mayoritariamente de tipo salvaje y algunas entre un extremo y el otro; así, las células hijas muestran diversos grados de heteroplasmia. **(b)** Grados diferentes de heteroplasmia producen diferentes fenotipos celulares. Esta sección de tejido muscular humano es de un individuo con citocromo oxidasa defectuosa. Las células se han teñido de modo que las células de tipo salvaje sean azules y las células con citocromo oxidasa mutante sean marrones. Tal como muestra la micrografía, diferentes células del mismo tejido están afectadas en grados diferentes por la mutación mitocondrial. [Fuente: Cortesía de Rob Taylor. Reproducido con permiso de R. W. Taylor y D. M. Turnbull, *Nature Rev. Genet.* 6:389, 2005. Fig. 2a.]



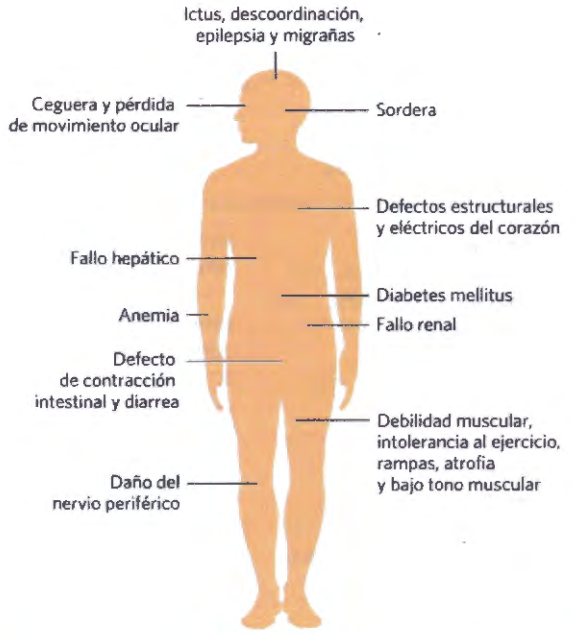


FIGURA 19-43 Mutaciones que producen enfermedades mitocondriales. Las mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales pueden producir enfermedades que afectan a muchos órganos y sistemas orgánicos. [Fuente: Información de S. B. Vafai y V. K. Mootha, *Nature* 491:374, 2012.]

un componente del Complejo III, también produce LHON lo que demuestra que la patología de la enfermedad es el resultado de una reducción general de la función mitocondrial y no específicamente de un defecto en la transferencia electrónica a través del Complejo I.

Una mutación (en *ATP6*) que afecta el poro de protones de la ATP sintasa produce velocidades bajas de síntesis e ATP mientras que la cadena respiratoria permanece intacta. El estrés oxidativo debido al suministro continuo de electrones desde el NADH aumenta la producción de ROS y las lesiones causadas por ROS a las mitocondrias establecen un círculo vicioso. La mitad de individuos con este gen mutante mueren a los pocos días o meses después del nacimiento.

La **enfermedad de la epilepsia mioclónica y de la fibra roja rota (MERRF)** está producida por una mutación en el gen mitocondrial que codifica un tRNA específico para lisina ($tRNA^{Lys}$). Esta enfermedad, caracterizada por sacudidas musculares incontrolables, es el resultado de la producción defectuosa de varias de las proteínas sintetizadas utilizando tRNA mitocondriales. Las fibras del músculo esquelético de los individuos con MERRF tienen mitocondrias con formas anormales que, a veces, contienen estructuras paracristalinas **(Fig. 19-44)**. Se piensa que otras mutaciones en los genes mitocondriales son las responsables del debilitamiento muscular progresivo que caracteriza la miopatía mitocondrial, así como del aumento de tamaño y deterioro del músculo cardíaco en la cardiomiopatía hipertrófica.

Si se sabe que una futura madre es portadora de un gen mitocondrial patogénico, la técnica de la donación de mitocondrias puede evitar el pase del gen mutante a su descendiente. Se transplantan microscópicamente los genes nucleares de la futura madre al huevo enucleado de un donante con mitocondrias sanas y, a continuación, se fertiliza el huevo in vitro y se transplanta el embrión resultante al útero de la madre. Este y otros procedimientos similares de "niño con tres padres", que se aprobaron en el Reino Unido en 2015, provocan discusiones éticas que son objeto de fuerte polémica.

Mutaciones en cualquiera de los aproximadamente 1.100 genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales también pueden tener como resultado enfermedades mitocondriales. Por ejemplo, una mutación en una de las proteínas codificadas en el núcleo del Complejo IV, COX6B1, produce defectos graves en el desarrollo del cerebro y paredes engrosadas del músculo cardíaco. Otros genes nucleares codifican proteínas esenciales para la *formación* de los complejos mitocondriales. Mutaciones en estos genes pueden dar lugar a enfermedades mitocondriales graves ■

Defectos en las mitocondrias de las células β pancreáticas pueden ser causa de diabetes

El mecanismo que regula la liberación de insulina de las células β pancreáticas depende de la concentración de ATP en esas células. Cuando la concentración de glucosa sanguínea es elevada, las células β captan glucosa que oxidan mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, aumentando la [ATP] por encima de un nivel umbral **(Fig. 19-45)**. Cuando la [ATP] excede este umbral, se cierra un canal de K^+ regulado por ATP de la membrana plasmática, despolarizando la membrana y desencadenando la liberación de insulina (Fig. 23-28). Las células β pancreáticas con defectos en la fosforilación oxidativa no pueden aumentar la [ATP] por encima del umbral con lo que el déficit en la liberación de insulina produce diabetes. Por ejemplo, defectos en el gen de la glucoquinasa, el isozima hexoquinasa IV presente en las células β, da lugar a una forma rara de diabetes, denominada MODY2 (véase el Recuadro 15-3); la baja actividad de la glucoquinasa impide la generación de una [ATP] por enzima del umbral lo que bloquea la secreción de insulina. Mutaciones en los genes del $tRNA^{Lys}$ o $tRNA^{Leu}$ mitocondriales también impiden la producción mitocondrial de ATP por lo que la diabetes mellitus tipo 2 es frecuente en individuos con estos defectos (aunque estos casos sólo constituyen una fracción muy pequeña de todos los casos de diabetes).

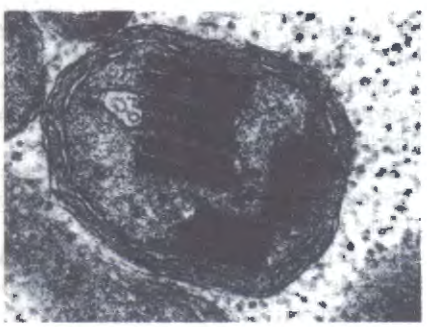


FIGURA 19-44 Inclusiones paracristalinas en una mitocondria MERRF. Micrografía electrónica de una mitocondria anormal del músculo de un individuo con MERRF, en la que se ven las inclusiones proteicas paracristalinas presentes, a veces, en las mitocondrias mutantes. [Fuente: D. Wallace et al., *Cell* 55:601, 1988. © Elsevier.]

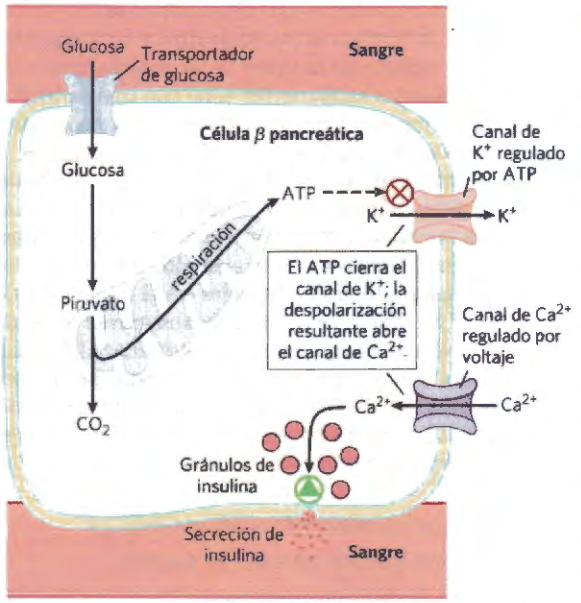


FIGURA 19-45 Un defecto mitocondrial impide la secreción de insulina. En la situación normal aquí descrita, cuando aumenta la glucosa sanguínea, aumenta la producción de ATP en las células β. El ATP, al bloquear los canales de K^+, despolariza la membrana plasmática abriendo así los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje. La entrada de Ca^{2+} resultante desencadena la exocitosis de vesículas secretoras que contienen insulina, liberando insulina. Cuando la fosforilación oxidativa es defectuosa en las células β, la [ATP] nunca es suficiente para desencadenar este proceso con lo que no se libera insulina.

Cuando la nucleótido de nicotinamida transhidrogenasa, que es parte de la defensa mitocondrial contra las ROS (véase la Fig. 19-18), es genéticamente defectuosa, la acumulación de ROS daña la mitocondria, disminuye la producción de ATP y bloquea la liberación de insulina por las células β (Fig. 19-45). Las lesiones causadas por ROS, entre las que se encuentran las lesiones en el mtDNA, también pueden estar en la base de otras enfermedades humanas; hay algunas pruebas de su intervención en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y en el fallo cardíaco, así como en el envejecimiento. ■

RESUMEN 19.5 Genes mitocondriales: su origen y efectos de las mutaciones

■ Una pequeña proporción de las proteínas mitocondriales humanas, 13 en total, están codificadas en el genoma mitocondrial y se sintetizan en el interior de la mitocondria. Unas 1.100 proteínas mitocondriales están codificadas en genes nucleares y se importan a la mitocondria después de su síntesis.

■ Las mitocondrias surgieron de bacterias aeróbicas que establecieron una relación endosimbiótica con eucariotas primitivos.

■ En el genoma mitocondrial s acumulan mutaciones a lo largo de la vida del organismo. Mutaciones en los genes nucleares o mitocondriales que codifican componentes de la cadena respiratoria, ATP sintasa y el sistema de eliminación de ROS, e incluso en los genes de tRNA, producen diversas enfermedades humanas que, a menudo, afectan con mayor severidad al músculo, corazón, células β pancreáticas y cerebro.

■ Es posible combinar las mitocondrias de una mujer con los genes nucleares de otra para crear un huevo sin una mutación que daría lugar a una enfermedad mitocondrial.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

teoría
quimiosmótica 707
cadena respiratoria 708
flavoproteína 710
equivalente
de reducción 710
ubiquinona
(coenzima Q, Q) 710
citocromos 711
proteína
ferro-sulfurada 712
proteína ferro-sulfurada
de Rieske 712
Complejo I 714
NADH
deshidrogenasa 714
vectorial 714
Complejo II 715
succinato
deshidrogenasa 715
especies reactivas de
oxígeno (ROS) 716
radical superóxido
Complejo III 716
complejo del
citocromo bc_1 716
ciclo Q 721
Complejo IV 721
citocromo oxidasa 716
criomicroscopia
electrónica 720
fuerza protón-motriz 721
ATP sintasa 725
F_1 ATPasa 728
catálisis rotacional 729
modelo del cambio
de fijación 731
razón P/O 738
razón P/2e^- 738
lanzadera del
malato-aspartato 739
lanzadera del glicerol
3-fosfato 739
control por aceptor 737
razón de acción
de masas (Q) 737
tejido adiposo marrón
(BAT) 740
proteína desacopladora 1
(UCP1) 740
citocromo P-450 740
xenobióticos 740
apoptosis 741
apoptosoma 741
caspasa 741
heteroplasmia 744
homoplasmia 744

Problemas

1. Reacciones de oxidación-reducción El complejo I, la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria mitocondrial, promueve la siguiente serie de reacciones de oxidación-reducción, en las que Fe^{3+} y Fe^{2+} representan el hierro de los centros ferro-sulfurados, Q es la ubiquinona, QH_2 el ubiquinol y E es el enzima:

(1) $NADH + H^+ + E\text{-}FMN \longrightarrow NAD^+ + E\text{-}FMNH_2$
(2) $E\text{-}FMNH_2 + 2Fe^{3+} \longrightarrow E\text{-}FMN + 2Fe^{2+} + 2H^+$
(3) $2Fe^{2+} + 2H^+ + Q \longrightarrow 2Fe^{3+} + QH_2$

Suma: $NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2$

Para cada una de las tres reacciones catalizadas por el complejo de la NADH deshidrogenasa, identifique (a) el dador electrónico, (b) el aceptor electrónico, (c) el par redox conjugado, (d) el agente reductor y (e) el agente oxidante.

2. Todas las partes de la ubiquinona tienen una función En la transferencia electrónica sólo la porción quinona de la ubiquinona experimenta óxido-reducción; la cadena isoprenoide permanece sin cambios. ¿Cuál es la función de esta cadena?

Copy-station

3. Utilización de FAD en lugar de NAD^+ en la oxidación del succinato Todas las deshidrogenasas de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico utilizan NAD^+ (E'° para NAD^+/NADH = -0,32 V) como aceptor electrónico excepto la succinato deshidrogenasa que utiliza FAD unido covalentemente (E'° para $FAD/FADH_2$ en este enzima = 0,050 V). Sugiera por qué el FAD es un receptor electrónico más adecuado que el NAD^+ en la deshidrogenación del succinato basándose en los valores de E'° del par fumarato/succinato (E'° = 0,031), el par NAD^+/NADH y el par $FAD/FADH_2$ de la succinato deshidrogenasa.

4. Grado de reducción de los transportadores electrónicos en la cadena respiratoria El grado de reducción de cada transportador electrónico de la cadena respiratoria viene determinado por las condiciones existentes en la mitocondria. Por ejemplo, cuando NADH y O_2 son abundantes, el grado de reducción en el estado estacionario de los transportadores disminuye a medida que los electrones pasan desde el sustrato al O_2. Cuando se bloquea la transferencia de electrones, los transportadores anteriores al bloqueo quedan más reducidos mientras que los de detrás quedan más oxidados (véase la Fig. 19-6). Para cada una de las condiciones que se dan a continuación, prediga el estado de oxidación de la ubiquinona y los citocromos b, c_1, c y $a + a_3$.

(a) Suministro abundante de NADH y O_2 pero con adición de cianuro

(b) Suministro abundante de NADH pero O_2 agotado

(c) Suministro abundante de O_2 pero NADH agotado

(d) Suministro abundante de NADH y O_2

5. Efecto de la rotenona y antimicina A sobre la transferencia electrónica La rotenona, producto tóxico natural de algunas plantas inhibe fuertemente la NADH deshidrogenasa de mitocondrias de insectos y peces. La antimicina A, un antibiótico tóxico, inhibe fuertemente la oxidación del ubiquinol.

(a) Explique por qué la ingestión de rotenona es letal para algunas especies de insectos y de peces.

(b) Explique por qué la antimicina A es un veneno.

(c) Suponiendo que la rotenona y la antimicina A son igualmente efectivas en el bloqueo de sus sitios respectivos en la cadena de transporte electrónico ¿cuál debería ser un veneno más potente? Explíquelo.

6. Desacoplantes de la fosforilación oxidativa En las mitocondrias normales la velocidad de transferencia electrónica está estrechamente acoplada a la demanda de ATP. Cuando la velocidad de utilización de ATP es relativamente baja, la velocidad de transferencia electrónica es baja; cuando aumenta la demanda de ATP, la velocidad de transferencia electrónica aumenta. En estas condiciones de estrecho acoplamiento, el número de moléculas de ATP producidas por átomo de oxígeno consumido cuando el dador electrónico es el NADH (la razón P/O) es próximo a 2,5.

(a) Prediga el efecto de una concentración relativamente baja y de una concentración relativamente alta de un agente desacoplante sobre la velocidad de transferencia electrónica y sobre la razón P/O.

(b) La ingestión de desacoplantes produce gran sudoración y un aumento de la temperatura corporal. Explique este fenómeno en términos moleculares. ¿Qué le sucede a la razón P/O en presencia de desacoplantes?

(c) El desacoplante 2,4-dinitrofenol se recetó en un tiempo como fármaco para la reducción de peso. ¿Cómo puede actuar este agente, en principio, como ayuda para la reducción de peso? Los agentes desacoplantes ya no se recetan porque con su uso se produjeron algunas muertes. ¿Por qué la ingestión de agentes desacoplantes puede causar la muerte?

7. Efectos de la valinomicina sobre la fosforilación oxidativa Cuando se añade el antibiótico valinomicina (véase la Fig. 11-42) a mitocondrias en respiración activa, ocurren varias cosas: disminuye la producción de ATP, aumenta la velocidad del consumo de O_2, se libera calor y aumenta el gradiente de pH a través de la membrana interna mitocondrial. ¿Cómo actúa la valinomicina, como un desacoplante o como un inhibidor de la fosforilación oxidativa? Explique las observaciones experimentales en función de la capacidad de transferir iones K^+ a través de la membrana mitocondrial interna.

8. La concentración de ADP celular controla la síntesis de ATP Aunque tanto el ADP como el P_i son necesarios para la síntesis de ATP, la velocidad de síntesis depende principalmente de la concentración de ADP pero no de la de P_i. ¿Por qué?

9. Ventajas de los supercomplejos en la transferencia electrónica Hay cada vez más pruebas de que los Complejos I, II, III y IV mitocondriales forman parte de un supercomplejo más grande. ¿Cuál podría ser la ventaja de tener los cuatro complejos dentro de un supercomplejo?

10. ¿Cuántos protones hay en una mitocondria? La transferencia de electrones funciona translocando protones desde la matriz mitocondrial al medio exterior estableciendo un gradiente de pH a través de la membrana interna (el exterior más ácido que el interior). La tendencia de los protones a difundir de nuevo desde el exterior a la matriz es la fuerza motriz para la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Durante la fosforilación oxidativa por una suspensión de mitocondrias en un medio de pH 7,4, el pH interno de la matriz era 7,7.

(a) Calcule la $[H^+]$ en el medio externo y en la matriz en estas condiciones.

(b) ¿Cuál es la razón exterior: interior en la $[H^+]$? Comente sobre la energía inherente en esta diferencia de concentración. (Sugerencia: vea la Ec. 11-4, p. 413).

(c) Calcule el número de protones en una mitocondria hepática en respiración suponiendo que el compartimiento de la matriz interna es una esfera de 1,5 μm de diámetro.

(d) A partir de estos datos ¿considera que el gradiente de pH por sí solo es suficientemente grande para generar ATP?

(e) En caso contrario, ¿puede indicar de qué modo puede surgir la energía necesaria para la síntesis de ATP?

11. Velocidad de recambio del ATP en el músculo de corazón de rata El músculo de corazón de rata que opera aeróbicamente cubre más del 90% de sus necesidades de ATP por fosforilación oxidativa. Cada gramo de tejido consume O_2 a la velocidad de 10,0 μmol/min cuando el combustible es la glucosa.

(a) Calcule la velocidad a la que el músculo de corazón consume glucosa y produce ATP.

(b) Si la concentración en el estado estacionario de ATP en el músculo cardíaco de rata es 5,0 μmol/g de tejido, calcule el tiempo requerido (en segundos) para el recambio completo del fondo celular de ATP. ¿Qué es lo que indica este resultado acerca de la necesidad de una estrecha regulación de la producción de ATP? (Nota: Las concentraciones se expresan en micromoles por gramo de tejido muscular ya que la mayor parte del tejido es agua).

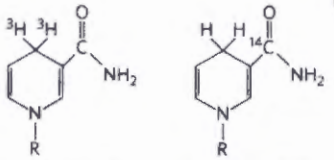
12. Velocidad de degradación del ATP en el músculo volador de insecto La producción de ATP en los músculos voladores de la mosca *Lucilia sericata* es casi exclusivamente el resultado de la fosforilación oxidativa. Durante el vuelo, se

necesitan 187 mL de O_2/h·g de peso corporal para mantener una concentración de ATP de 7,0 μmol/g de músculo volador. Suponiendo que los músculos voladores representan el 20% del peso de la mosca, calcule la velocidad a la que se recambia el ATP del músculo volador. En ausencia de fosforilación oxidativa ¿cuánto tiempo duraría la reserva de ATP? Suponga que los equivalentes de reducción se transfieren desde la lanzadora del glicerol-3-fosfato y que el O_2 está a 25 °C y 101,3 kPa (1 atm).

13. Elevada concentración de alanina en sangre asociada a defectos de la fosforilación oxidativa Se ha encontrado que la mayoría de individuos con defectos genéticos en la fosforilación oxidativa tienen concentraciones relativamente elevadas de alanina en su sangre. Explique esto en términos bioquímicos.

14. Compartimentalización de los componentes del ciclo del ácido cítrico La isocitrato deshidrogenasa se encuentra únicamente en la mitocondria, pero la malato deshidrogenasa se encuentra tanto en la mitocondria como en el citosol. ¿Cuál es el papel de la malato deshidrogenasa citosólica?

15. Movimiento transmembrana de equivalentes de reducción En condiciones aeróbicas, el NADH extramitocondrial se ha de oxidar a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Considere una preparación de hepatocitos de rata que contienen mitocondrias así como todos los enzimas del citosol. Si se introduce [4-^{3}H]NADH, aparece rápidamente radiactividad en la matriz mitocondrial. Sin embargo, si se introduce [7-^{14}C]NADH no aparece radiactividad en la matriz. ¿Qué nos dicen estas observaciones acerca de la oxidación de NADH extramitocondrial por la cadena de transporte electrónico?



[4-^{3}H]NADH [7-^{14}C]NADH

COPY-STATION

16. Reservas de NAD y actividades deshidrogenasa Aunque tanto la piruvato deshidrogenasa como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa utilizan NAD^+ como aceptor de electrones, los dos enzimas no compiten por la misma reserva de NAD celular. ¿Por qué?

17. Sistema de transporte malato-α-cetoglutarato El sistema de transporte que lleva malato y α-cetoglutarato a través de la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 19-31) es inhibido por el *n*-butilmalonato. Suponga que se añade *n*-butilmalonato a una suspensión aeróbica de células de riñón que utilizan exclusivamente glucosa como combustible. Prediga el efecto de este inhibidor sobre (a) la glucólisis, (b) el consumo de oxígeno, (c) la formación de lactato, y (d) la síntesis de ATP.

18. Escalas de tiempo en los procesos reguladores de la mitocondria Compare las probables escalas de tiempo para los ajustes en la velocidad de respiración causados por (a) aumento en la [ADP] y (b) reducción de pO_2. ¿Qué es lo que explica la diferencia?

19. Efecto Pasteur Cuando se añade O_2 a una suspensión anaeróbica de células que utilizan glucosa a una velocidad elevada, la velocidad de consumo de glucosa desciende de manera espectacular a medida que se consume el O_2 añadido. Además, cesa la producción de lactato. Este efecto, observado primeramente por Louis Pasteur en la década de 1860, es característico de la mayoría de células capaces del catabolismo de la glucosa tanto en forma aeróbica como anaeróbica.

(a) ¿Por qué cesa la acumulación de lactato después de la adición de O_2?

(b) ¿Por qué la presencia de O_2 disminuye la velocidad de consumo de glucosa?

(c) ¿De qué forma el inicio del consumo de O_2 hace que la velocidad de consumo de glucosa sea más lenta? Explíquelo en función de enzimas específicos.

20. Mutantes de levadura deficientes en respiración y producción de etanol Se pueden generar mutantes de levadura deficientes en respiración (p^-; "petites") a partir de progenitores de tipo salvaje mediante tratamiento con agentes mutagénicos. Los mutantes no tienen citocromo oxidasa, un déficit que afecta de manera drástica su comportamiento metabólico. Un efecto sorprendente es que la fermentación no es suprimida por el O_2, es decir, los mutantes no muestran el efecto Pasteur (véase el problema 19). Algunas compañías están muy interesadas en utilizar estos mutantes en la fermentación de astillas de madera para producir etanol como combustible. Explique las ventajas del uso de estos mutantes en lugar de la cepa de levadura salvaje en las producciones de etanol a gran escala. ¿Por qué la falta de citocromo oxidasa anula el efecto Pasteur?

21. Enfermedad mitocondrial y cáncer Mutaciones en los genes que codifican ciertas proteínas mitocondriales están asociadas a una elevada incidencia de algunos tipos de cáncer. ¿De qué modo podrían las mitocondrias defectuosas provocar cáncer?

22. Gravedad variable de una enfermedad mitocondrial Diferentes individuos afectados por una enfermedad causada por el mismo defecto específico del genoma mitocondrial pueden tener síntomas que van de leve a grave. Explique el por qué.

23. Diabetes como consecuencia de defectos mitocondriales La glucoquinasa es esencial para el metabolismo de la glucosa en las células β pancreáticas. Los humanos con dos copias defectuosas del gen de la glucoquinasa muestran una diabetes neonatal severa, mientras que los que sólo tienen una copia defectuosa del gen tienen una forma de enfermedad mucho más leve (diabetes de los jóvenes de aparición madura, MODY2). Explique esta diferencia en función de la biología de la célula β.

24. Efectos de mutaciones en el Complejo II mitocondrial Cambios en un único nucleótido del gen de la succinato deshidrogenasa (Complejo II) se asocian con tumores cancerígenos del intestino medio. Sugiera un mecanismo que explique esta observación.

Problema de análisis de datos

25. Identificación de una proteína crucial para la actividad de la ATP sintasa Gran parte de nuestro conocimiento sobre los pasos de la cadena respiratoria y mecanismo de la ATP sintasa se consiguieron diseccionando la ruta mediante el uso de diversos inhibidores y desacoplantes (véase la Tabla 19-4) así como mutantes bacterianos. En este problema veremos cómo Robert Fillingame utilizó la diciclohexilcarbodiimida (DCCD) y mutantes de *E. coli* resistentes a sus efectos

para identificar los componentes que después se denominaron subunidades c de la porción F_o de la ATP sintasa.

La DCCD reacciona con los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los residuos Asp y Glu. Cuando se añade DCCD a una suspensión de mitocondrias intactas en respiración activa, la velocidad de transferencia electrónica (medida por el consumo de O_2) y la velocidad de producción de ATP disminuyen de manera espectacular. Si se añade ahora una solución de 2,4-dinitrofenol (DNP) a la preparación, el consumo de O_2 vuelve a la normalidad, pero la producción de ATP continúa inhibida.

Explique el efecto del DNP sobre la preparación mitocondrial inhibida.

¿Qué proceso es inhibido por la DCCD, la transferencia electrónica o la síntesis de ATP?

E. coli realiza la fosforilación oxidativa con una maquinaria notablemente similar a la de los mamíferos, si bien *E. coli* se somete mucho más fácilmente a la selección por mutación. La adición de DCCD a un cultivo de *E. coli* de tipo salvaje (cepa AN180) en crecimiento aeróbico bloquea el crecimiento en una forma que depende del tiempo y la dosis.

Fillingame seleccionó una mutante de *E. coli* (RF-7) resistente a la DCCD en la que el crecimiento aeróbico solo disminuía ligeramente en presencia de DCCD. A continuación, necesitó demostrar que el componente resitente a la DCCD en sus cepas de *E. coli* era la ATP sintasa. Aisló la fracción de membrana de las cepas de tipo salvaje y RF-7 y midió la actividad ATPasa en presencia y ausencia de DCCD. Encontró una inhibición dependiente del tiempo y de la dosis de la actividad ATPasa en la fracción de membrana del tipo salvaje, pero no en la fracción de membrana de la RF-7.

¿Por qué Fillingame midió la actividad ATPasa en lugar de la actividad ATP sintasa?

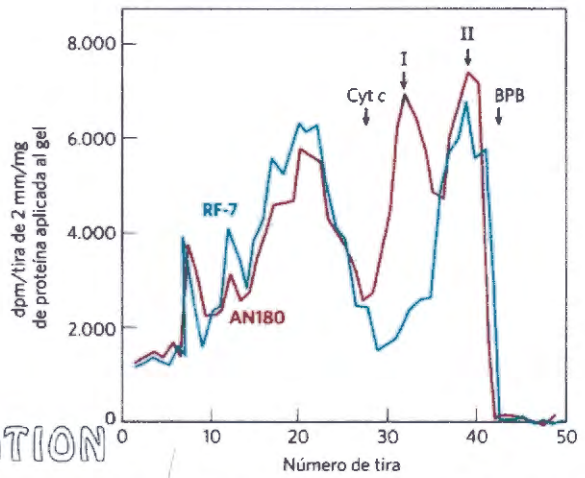
La proteína de unión de DCCD del mutante RF-7 ¿está ausente o solo alterada?

Fillingame quiso saber si la proteína sensible a la DCCD era una parte integral de la membrana o se podía solubilizar en la fracción que contenía la actividad ATPasa. Preparó fracciones de "membranas vaciadas" (sin ATPasa) y de "ATPasa soluble" tanto de células de tipo salvaje como de mutante RF-7, tratando membranas intactas con ditiotreitol. Midió la actividad ATPasa en las membranas nativas, en las membranas vaciadas y en sistemas reconstituidos mezclando las membranas vaciadas con la fracción soluble de la cepa de tipo salvaje o del mutante RF-7. Tanto las membranas nativas como los sistemas reconstituidos tenían actividad ATPasa; las fracciones de membranas vaciadas tenían muy poca actividad. Habiendo establecido que todas las combinaciones de sistemas reconstituidos tenían una actividad ATPasa similar, Fillingame añadió entonces DCCD para ver qué combinaciones eran inhibidas.

¿Qué resultados esperaría si la proteína de unión de DCCD se encontrase en las membranas vaciadas? ¿Qué esperaría si estuviese en la fracción soluble?

Los resultados fueron claros. Para las membranas vaciadas de células de tipo salvaje, la ATPasa reconstituida era sensible a la DCCD, independientemente de la fuente de la fracción soluble. Para las membranas vaciadas de las células mutantes, la ATPasa reconstituida era insensible a la DCCD. Por tanto, la sensibilidad a la DCCD se debe a una proteína en la fracción de membrana vaciada y no a una proteína de la fracción solubilizada con ditiotreitol.

Para identificar la proteína sensible a la DCCD, Fillingame expuso membranas intactas de *E. coli* del tipo salvaje (AN180) y de RF-7 a DCCD marcada con ^{14}C, a continuación utilizó SDS-PAGE para separar las proteínas. Cortó el gel en tiras delgadas desde el fondo hasta la parte superior y determinó el contenido en ^{14}C de cada tira, medido en desintegraciones por minuto (dpm) por tira de gel de 2 mm. Los resultados se representan abajo. Las flechas indican citocromo *c*, utilizado como marcador de masa molecular; los picos I y II, picos de interés y BPB, azul de bromofenol, un colorante que indica el frente de la muestra a medida que se desplaza en el gel. Se marcaron muchas proteínas de cada muestra con [^{14}C]DCCD (medido en dpm, desintegraciones por minuto)



¿Cómo supo Fillingame qué proteína(s) marcada(s) eran de interés?

Cuando repitió el experimento utilizando "membranas vaciadas", preparadas como antes, encontró que la misma proteína estaba marcada específicamente en la fracción de tipo salvaje. ¿Por qué era necesario este paso?

Se encontró que la proteína de interés tenía una M_r de aproximadamente 9 kDa y que era fácilmente soluble en un disolvente apolar (cloroformo/metano). ¿Qué pudo deducir Fillingame sobre la estructura, localización y topología de esta proteína?

En trabajos posteriores, Fillingame encontró que el residuo que reacciona con la DCCD en la proteína es Asp^{61}. Un mutante de *E. coli* en el que esta proteína tiene un residuo Ser sustituyendo Ala^{21} es mucho menos sensible a la inhibición por DCCD que la del tipo salvaje. ¿Qué explicación puede dar para esta observación?

Estudios exhaustivos de esta proteína inhibida por DCCD han demostrado que constituye una parte importante de la F_oF_1 ATP sintasa de bacterias, plantas y animales. ¿Cuál es su papel en la fosforilación oxidativa?

Referencias

Fillingame, R.H. 1975. Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 5'-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124:870–883.

COPYSTATION

CAPÍTULO 20

Fotosíntesis y síntesis de glúcidos en plantas

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

20.1 Absorción de la luz 752
20.2 Centros de reacción fotoquímicos 758
20.3 Síntesis de ATP por fotofosforilación 769
20.4 Evolución de la fotosíntesis oxigénica 771
20.5 Reacciones de asimilación del carbono 775
20.6 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM 786
20.7 Biosíntesis de almidón, sacarosa y celulosa 792
20.8 Integración del metabolismo de glúcidos en plantas 799

COPYSTATION

Hemos llegado ahora a un cambio radical en nuestro estudio del metabolismo celular. Hasta el momento, en la Parte II hemos discutido de qué modo los principales combustibles metabólicos –glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos- se degradan a través de rutas *catabólicas* convergentes para entrar en el ciclo del ácido cítrico y ceder sus electrones a la cadena respiratoria, impulsando la síntesis de ATP mediante fosforilación *oxidativa*. Contemplamos ahora la síntesis de ATP acoplada al flujo de electrones hasta el oxígeno *impulsado por la luz* y, a continuación, las rutas *anabólicas*, que utilizan la energía química en forma de ATP y NADH o NADPH para sintetizar componentes celulares a partir de moléculas precursoras más sencillas. Las vías anabólicas son, generalmente, reductoras más que oxidativas. Catabolismo y anabolismo tienen lugar simultáneamente y en un estado estacionario dinámico, por lo que la reducción de componentes celulares que producen energía se equilibran con los procesos biosintéticos que crean y mantienen el intrincado orden de las células vivas.

La captura de la energía solar por los organismos fotosintéticos y su conversión en la energía química de los compuestos orgánicos reducidos es la fuente última de casi toda la energía biológica y de los precursores orgánicos en la tierra. La evolución de la fotosíntesis oxigénica (que desprende oxígeno) hace unos 2.500 millones de años y el consiguiente aumento del oxígeno atmosférico, moldeó el panorama metabólico que hemos heredado. Los organismos fotosintéticos y heterotróficos viven en un estado estacionario en equilibrio en la biosfera **(Fig. 20-1)**. Los organismos fotosintéticos atrapan la energía solar en forma de ATP y NADPH, que utilizan como fuentes de energía para fabricar glúcidos y otros compuestos orgánicos a partir de CO_2 y H_2O; simultáneamente, liberan O_2 a la atmósfera

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + O_2$$

Los heterótrofos aeróbicos (humanos, por ejemplo, así como también vegetales durante los períodos oscuros) utilizan el O_2 así formado para degradar los productos orgánicos de la fotosíntesis ricos en energía a CO_2 y H_2O, generando ATP. El CO_2 vuelve a la atmósfera para ser usado de nuevo por los organismos fotosintéticos. De este modo la energía solar proporciona la fuerza

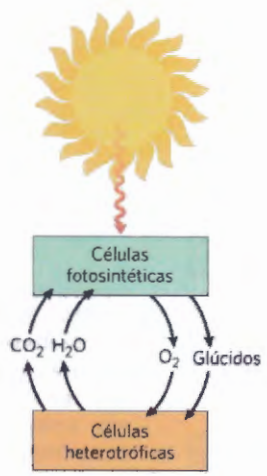


FIGURA 20-1 La energía solar es la fuente fundamental de toda la energía biológica. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar para fabricar glucosa y otros productos orgánicos que son utilizados por las células heterotróficas como fuentes de energía y de carbono.

impulsora para el ciclado continuo de CO_2 y O_2 a través de la biosfera y proporciona los sustratos reducidos (combustibles tales como la glucosa) de los que dependen los organismos no fotosintéticos.

En el capítulo empezamos con la **fotosíntesis**, que abarca dos procesos: las **reacciones dependientes de la luz**, en las que la luz solar proporciona la energía para la síntesis de ATP y NADPH y las **reacciones de asimilación del carbono** (o **reacciones de fijación del carbono**), en la que el ATP y el NAPH se utilizan para reducir el CO_2 a triosa fosfatos a través de una serie de reacciones conocidas como ciclo de Calvin **(Fig. 20-2)**. La fotorrespiración es una reacción secundaria no productiva que tiene lugar durante la fijación de O_2 por lo que veremos las diferentes maneras de evitarla por ciertas plantas. A continuación, discutiremos la conversión de las triosas producidas en el ciclo de Calvin a sacarosa (para el transporte de azúcares) y almidón (para el almacenaje de energía), lo que se consigue con mecanismos análogos a los utilizados por las células animales para producir glucógeno. También describiremos la síntesis de la celulosa de las paredes celulares vegetales. Finalmente, consideramos cómo se integra el metabolismo glucídico dentro de una célula vegetal y a lo largo del cuerpo de la planta.

20.1 Absorción de la luz

El proceso de la **fotofosforilación** se parece a la fosforilación oxidativa (Capítulo 19) en que el flujo de los electrones a través de una serie de transportadores de la membrana está acoplado al bombeo de protones, produciendo la fuerza protón-motriz que propulsa la formación de ATP. En la fosforilación oxidativa el dador electrónico es el NADH y el aceptor electrónico final es el O_2, formando H_2O. En la fotofosforilación, los electrones fluyen en la dirección opuesta: el H_2O es el *dador* electrónico y se *forma* NADPH. ¿Cómo son posibles estos procesos endergónicos?

El agua es un dador de electrones pobre, su potencial de reducción estándar es 0,816 V, comparado con los -0,320 V del NADH, un buen dador electrónico. La fotosíntesis requiere la aportación de energía en la forma de luz para *crear* un buen dador electrónico y un buen aceptor electrónico. Los electrones fluyen desde el dador electrónico a través de una serie de transportadores unidos a la membrana, incluidos citocromos, quinonas y proteínas ferro-sulfuradas, mientras que los protones se bombean a través de la membrana para crear un potencial electroquímico. La transferencia de electrones y el bombeo de protones están catalizados por un complejo de la membrana homólogo en estructura y función al Complejo III mitocondrial. El potencial electroquímico así producido es la fuerza impulsora para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i, catalizado por un complejo ATP sintasa unido a la membrana muy similar al de las mitocondrias y bacterias. El proceso se resume en la **Figura 20-3**.

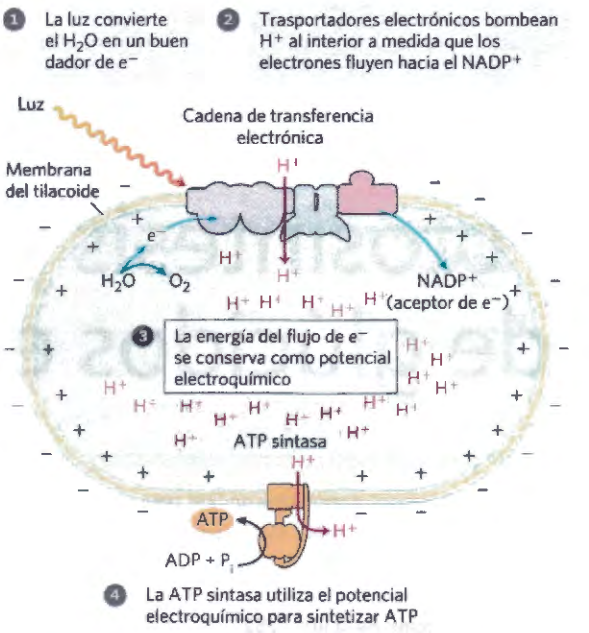


FIGURA 20-3 Mecanismo quimiosmótico de la síntesis de ATP en cloroplastos. El desplazamiento de electrones a través de una cadena de transportadores electrónicos está impulsado por la energía de los fotones absorbidos por el pigmento verde clorofila. El flujo electrónico conduce al desplazamiento de protones y cargas positivas a través de la membrana, lo que crea un potencial electroquímico. Este potencial electroquímico impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa ligada a la membrana, que es básicamente similar en estructura y mecanismo con la ATP sintasa de mitocondrias. La comparación con la Figura 19-1 muestra las muchas similitudes y diferencias significativas entre la síntesis quimiosmótica de ATP en cloroplastos y mitocondrias.

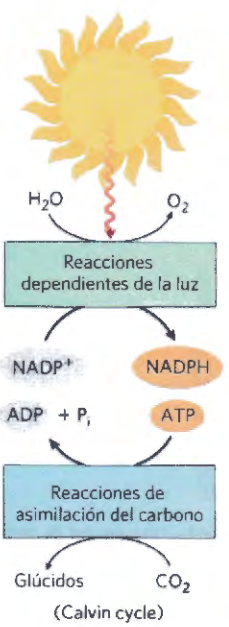


FIGURA 20-2 Las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis generan NADPH y ATP ricos en energía a expensas de la energía solar. NADPH y ATP se utilizan en las reacciones de asimilación de carbono, que tienen lugar en la luz o en la oscuridad, para reducir CO_2 y formar triosas y otros compuestos más complejos (tales como la glucosa) derivados de las triosas.

Los cloroplastos son el sitio del flujo electrónico y de la fotosíntesis impulsados por la luz en los vegetales

En las células eucarióticas fotosintéticas tanto las reacciones dependientes de la luz como las de asimilación de carbono tienen lugar en los **cloroplastos (Fig. 20-4)**, orgánulos de forma variable y que tienen, generalmente, unos pocos micrómetros de diámetro. Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos están rodeados de dos membranas, una membrana externa que es permea-

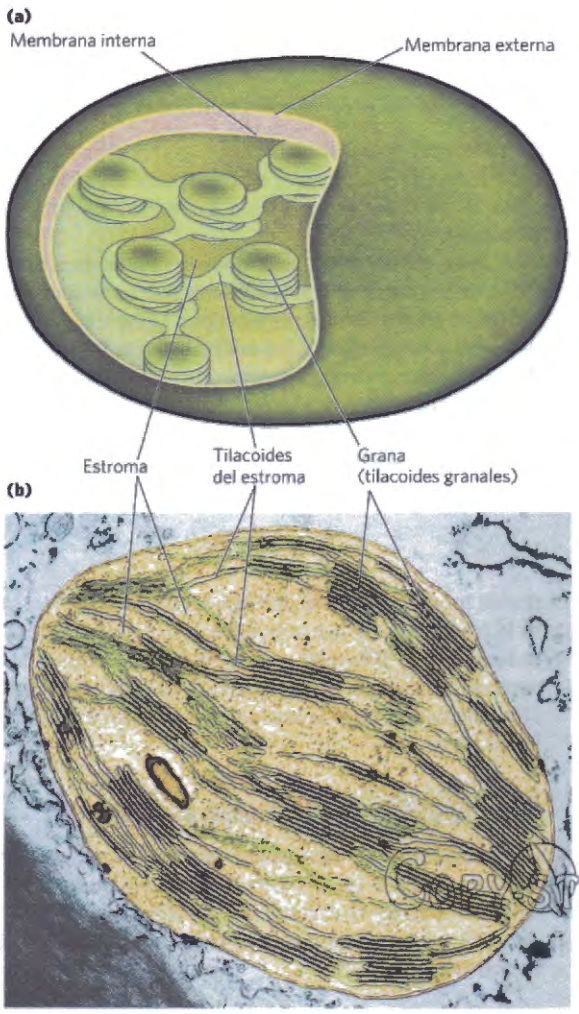


FIGURA 20-4 Cloroplasto. (a) Diagrama esquemático. **(b)** Micrografía electrónica a alta ampliación mostrando los grana que son pilas de membranas de tilacoides.

ble a pequeñas moléculas e iones y una membrana interna que encierra el compartimiento interno. Este compartimiento se denomina **estroma** en los cloroplastos y es análogo a la matriz mitocondrial; es una fase acuosa que contiene la mayoría de enzimas necesarios en las reacciones de asimilación del carbono. A través de todo el estroma se encuentra un conjunto de membranas internas con muchos repliegues, análogo a las crestas mitocondriales; estas membranas son topológicamente continuas, formando un único compartimiento o lumen. Este complejo sistema membranoso forma sacos aplanados llamados **tilacoides**. Los **tilacoides granales** son bolsas parecidas a discos ordenados en pilas; están conectados por los **tilacoides estromales**, que son más planos y se disponen en forma de espiral alrededor de las pilas de grana. Incrustados en las membranas tilacoides, comúnmente denominadas **lamelas**, se encuentran los pigmentos fotosintéticos y complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones dependientes de la luz y la síntesis de ATP. El sistema membranoso y sus componentes incrustados están en constante remodelado, adaptándose a los cambios en la disponibilidad de luz y las demandas de la planta en cuanto a

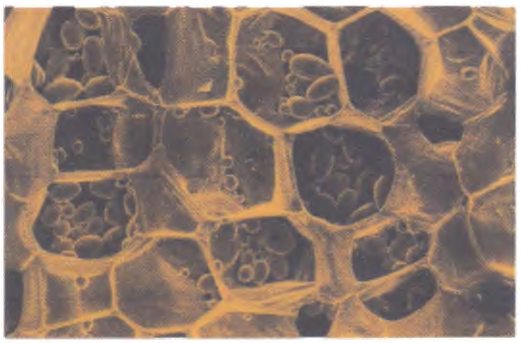


FIGURA 20-5 Amiloplastos rellenos de almidón. Esta micrografía electrónica de barrido coloreada de una sección fina de patata cruda muestra células rellenas con amiloplastos, orgánulos en los que se almacenan los gránulos de almidón. Los gránulos de almidón de diversos tejidos van de 1 a 100 μm de diámetro. [Fuente: Dr. Jeremy Burgess/ Science Source].

energía y poder reductor. La membrana interna de los cloroplastos, como la de todos los plastidios, son impermeables a las moléculas polares y cargadas. El tráfico a través de estas membranas está facilitado por conjuntos de transportadores específicos.

Los cloroplastos no son más que uno entre diversos tipos de **plastidios**, orgánulos propios de algas y vegetales. Los plastidios son orgánulos que se autorreproducen incluidos dentro de una doble membrana y que contienen un pequeño genoma, el **plastoma**, que codifica algunas de sus proteínas. La mayor parte de proteínas destinadas a plastidios están codificadas por genes nucleares, que se transcriben y traducen como los demás genes nucleares; las proteínas se importan a continuación a los plastidios. Los plastidios se reproducen por fisión binaria, replicando su plastoma (una sola molécula de DNA circular) y utilizan sus propios enzimas y ribosomas para sintetizar las proteínas codificadas por aquel plastoma. Los **amiloplastos** son plastidios incoloros (es decir, carecen de clorofila y otros cromóforos presentes en los cloroplastos). No tienen membranas internas análogas a las membranas tilacoides de los cloroplastos y en los tejidos de plantas ricas en almidón estos plastidios están repletos de gránulos de almidón **(Fig. 20-5)**. Los cloroplastos se pueden convertir en **proplastidios** por pérdida de membranas internas y de clorofila y los proplastidios son interconvertibles con los amiloplastos **(Fig. 20-6)**. A su vez, tanto amiloplastos como proplastidios pueden desarrollarse para dar cloroplastos. La abundancia relativa de los tipos de plastidios depende del tipo de tejido vegetal y de la intensidad de la iluminación. Las células de las hojas verdes son ricas en cloroplastos, mientras que los amiloplastos dominan en tejidos no fotosintéticos que almacenan almidón en grandes cantidades como, por ejemplo, los tubérculos de patata.

En 1937, Robert Hill encontró que cuando se iluminan extractos de hoja que contienen cloroplastos, (1) se desprende O_2 y (2) se reduce un aceptor de electrones no biológico añadido al medio, según la **reacción de Hill**:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} 2AH_2 + O_2$$

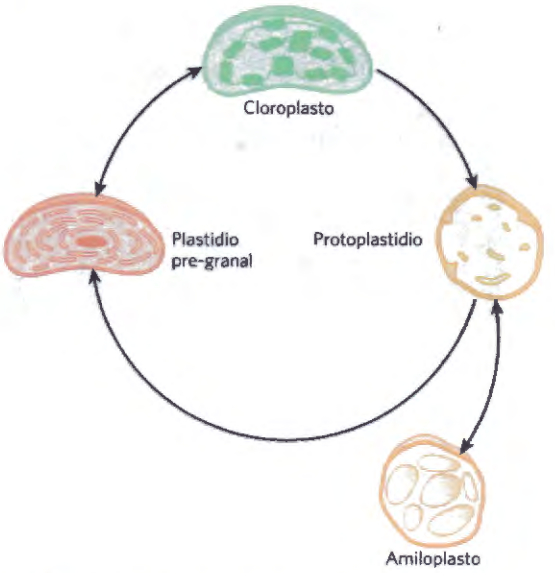
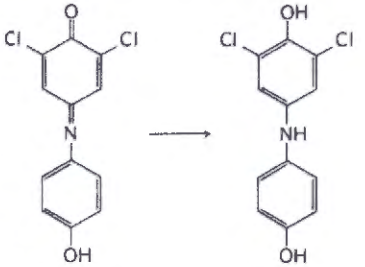


FIGURA 20-6 Plastidios: sus orígenes e interconversiones. Todos los tipos de plastidios están limitados por una doble membrana, y algunos (especialmente los cloroplastos maduros) tiene extensas membranas internas. Las membranas internas pueden perderse (como cuando un cloroplasto maduro se convierte en un propiastidio) y resintetizarse (como cuando un proplastidio da lugar a un plastidio pre-granal y, a continuación, un cloroplasto maduro). Los proplastidios de tejidos no fotosintéticos (por ejemplo, una raíz) dan lugar a amiloplastos que contienen grandes cantidades de almidón. Todas las células vegetales tienen plastidios, y estos orgánulos son los sitios no solo de la fotosíntesis sino también de otros procesos, tales como la síntesis de aminoácidos esenciales, tiamina, piridoxal fosfato, flavinas y vitaminas A, C, E y K.

donde A es el aceptor de electrones artificial o **reactivo de Hill**. Un reactivo de Hill, el colorante 2,6-diclorofenolindofenol, en su forma oxidada (A) es azul siendo incoloro en su forma reducida (AH2) lo que hace fácil seguir la reacción.



2,6-Diclorofenolindofenol

Cuando se iluminaba un extracto de hojas suplementado con el colorante, el color azul se volvía incoloro al tiempo que se desprendía O_2. En la oscuridad ni se desprendía O_2 ni se reducía el colorante. Ésta fue la primera prueba de que la energía luminosa absorbida hace que fluyan electrones desde el H_2O a un aceptor electrónico. Además, Hill encontró que no se requería CO_2 para esta reacción ni se reducía en estas condiciones a una forma estable; podía disociarse el desprendimiento de O_2 de la reducción del CO_2. Varios años más tarde Severo Ochoa encontró que el $NADP^+$ es el aceptor electrónico biológico en los cloroplastos, según la ecuación

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{luz} 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Para comprender este proceso fotoquímico hemos de considerar primeramente el tema más general de los efectos de la absorción de la luz sobre la estructura molecular.

La luz visible es radiación electromagnética de longitud de onda entre 400 y 700 nm, que es una pequeña parte del espectro electromagnético **(Fig. 20-7)**, yendo desde el violeta al rojo. La energía de un **fotón** individual (un cuanto de luz) es mayor en el extremo violeta del espectro que en el rojo; longitudes de onda menores (y mayor frecuencia) se corresponden con una mayor energía. La energía, E, de un fotón individual viene dada por la ecuación de Planck:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

donde h es la constante de Planck (6,626 x 10-34 J·s), ν es la frecuencia de la luz en ciclos/s, c es la velocidad de la luz (3,00 x 108 m/s) y λ es la longitud de onda en metros. La energía de un fotón de luz visible va desde 150 kJ/einstein para la luz roja a ~300 kJ/einstein para la luz violeta.

EJEMPLO PRÁCTICO 20-1 Energía de un fotón

La luz utilizada por las plantas vasculares tiene una longitud de onda de unos 700 nm. Calcule la energía en un "mol" de fotones (un einstein) de luz de esta longitud de onda y compárela con la energía necesaria para sintetizar un mol de ATP.

Solución: La energía de un fotón individual viene dada por la ecuación de Planck. A una longitud de onda de 700 x 10-9 m, la energía del fotón es

$$= \frac{[(6{,}626 \times 10^{-34}\,\text{J·s})(3{,}00 \times 10^{8}\,\text{m/s})]}{(7.00 \times 10^{-7}\text{m})}$$
$$= 2{,}84 \times 10^{-19}\,\text{J}$$

Un einstein de luz es el número de Avogadro (6,022 x 1023) de fotones por lo que la energía de un einstein de fotones a 700 nm viene dada por

$$(2{,}84 \times 10^{-19}\,\text{J/fotón})(6{,}022 \times 10^{23}\,\text{fotones/einstein})$$
$$= 17{,}1 \times 10^{4}\,\text{J/einstein}$$
$$= 171\,\text{kJ/einstein}$$

Por tanto, un "mol" de fotones de luz roja tiene unas cinco veces la energía necesaria para producir un mol de ATP a partir de ADP y Pi (30,5 kJ/mol).

Cuando se absorbe un fotón se eleva un electrón de la molécula que lo absorbe (cromóforo) a un nivel energético superior. Esto sucede según un proceso de todo o nada; para ser absorbido el fotón ha de contener una cantidad de energía, denominada un **cuanto**, que iguale exactamente la energía de la transición electrónica. Una molécula que ha absorbido un fotón se encuentra en un

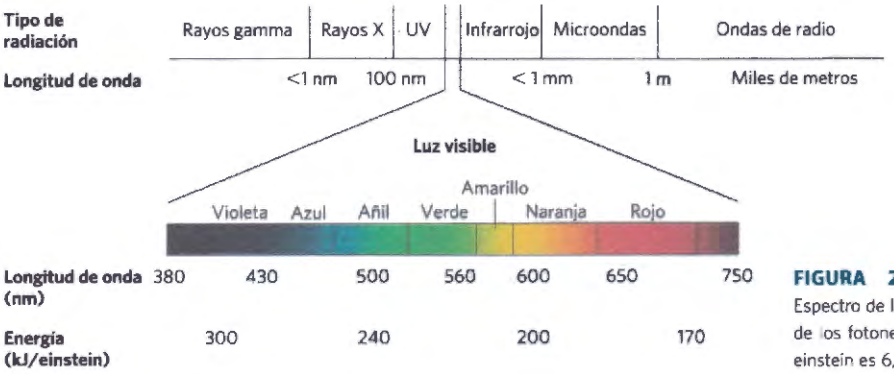


FIGURA 20-7 Radiación electromagnética. Espectro de la radiación electromagnética y energía de los fotones en la gama visible del espectro. Un einstein es 6,022 x 10^{23} fotones.

estado excitado que, en general, es inestable. Los electrones elevados a orbitales de energía superior usualmente vuelven rápidamente a sus orbitales de menor energía; la molécula excitada vuelve (decae) al **estado basal** estable, dejando ir el cuanto absorbido en forma de luz o calor o utilizándolo para realizar trabajo químico. La luz emitida durante el decaimiento de las moléculas excitadas, denominada **fluorescencia**, es siempre de una longitud de onda superior (menor energía) que la de la luz absorbida (véase el Recuadro 12-2). Un modo alternativo de decaimiento importante en la fotosíntesis implica la transferencia directa de la energía de excitación desde una molécula excitada a una molécula vecina. De la misma manera que el fotón es un cuanto de energía luminosa, el **excitón** es un cuanto de energía pasada desde una molécula excitada a otra molécula en un proceso denominado **transferencia de excitón**.

Las clorofilas absorben energía luminosa para la fotosíntesis

Los pigmentos más importantes que absorben luz en las membranas de los tilacoides son las **clorofilas**, pigmentos verdes con estructuras policíclicas planas que se parecen a la protoporfirina de la hemoglobina (véase la Fig. 5-1), excepto en que la posición central está ocupada por Mg^{2+} en lugar de Fe^{2+} **(Fig. 20-8a)**. Los cuatro átomos de nitrógeno orientados hacia el interior de la clorofila están coordinados con el Mg^{2+}.Todas las clorofilas tienen una cadena lateral larga de **fitol**, esterificado a un grupo carboxilo sustituyente del anillo IV. Además, las clorofilas tienen un quinto anillo de cinco átomos que no está presente en el hemo.

El sistema de cinco anillos heterocíclicos que rodea el Mg^{2+} tiene una estructura poliénica extendida con enlaces sencillos y dobles alternantes. Este tipo de polienos muestra una absorción fuerte característica en la región visible del espectro **(Fig. 20-9)**; las clorofilas tiene coeficientes de absorción molar anormalmente elevados (véase el Recuadro 3-1) por lo que están especialmente capacitadas para absorber la luz visible durante la fotosíntesis.

Los cloroplastos siempre contienen tanto clorofila *a* como clorofila *b* (Fig. 20-8a). Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes (Fig. 20-9) para que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región visible. La mayoría de plantas contienen aproximadamente el doble de clorofila *a* que de clorofila *b*. Los pigmentos de las algas y de las bacterias fotosintéticas contienen clorofilas que sólo difieren ligeramente de los pigmentos de las plantas.

Las cianobacterias y las algas rojas utilizan **ficobilinas** tales como la ficoeritrobilina y la ficocianobilina (Fig. 20-8b) como pigmentos capturadores de luz. Estos tetrapirroles de cadena abierta tienen el sistema poliénico extendido que se encuentra en las clorofilas, pero no su estructura cíclica ni su Mg^{2+} central. Las ficobilinas están unidas covalentemente a proteínas de unión específicas, formando las **ficobiliproteínas**, que se asocian en complejos altamente ordenados llamados ficobilisomas que representan las principales estructuras de captación de luz en estos microorganismos.

COPYSTATION

Los pigmentos accesorios aumentan la gama de absorción de la luz

Además de clorofilas, las membranas tilacoides contienen pigmentos secundarios o **pigmentos accesorios**, que también absorben la luz, llamados carotenoides. Los **carotenoides** pueden ser amarillos, rojos o púrpura. Los más importantes son el **β-caroteno**, que es un compuesto isoprenoide de color rojo anaranjado, y el carotenoide amarillo **luteína** (Fig. 20-8c, d). Los carotenoides absorben luz de longitud de onda diferente de la absorbida por las clorofilas (Fig. 20-9) por lo que son receptores luminosos suplementarios. También protegen a otros componentes de una forma altamente reactiva del oxígeno (oxígeno singlete) que se forma cuando la luz intensa excede la capacidad del sistema de aceptar electrones.

La determinación experimental de la efectividad de la luz de diferentes colores para promover la fotosíntesis da lugar a un **espectro de acción (Fig. 20-10)** que a menudo es útil para identificar el pigmento responsable principal de un efecto biológico de la luz. Al capturar luz en una región del espectro no utilizada por otros organismos, un organismo fotosintético puede conquistar un nicho ecológico propio. Por ejemplo, las ficobilinas, presentes en algas rojas y en cianobacterias, absorben luz en la región de 520 a 630 nm (Fig. 20-9), permitiendo a estos organismos vivir en nichos en los que la luz de longitudes de onda mayores o menores ha sido filtrada por los pigmentos de otros organismos que viven en el agua por encima de ellas o por la propia agua.

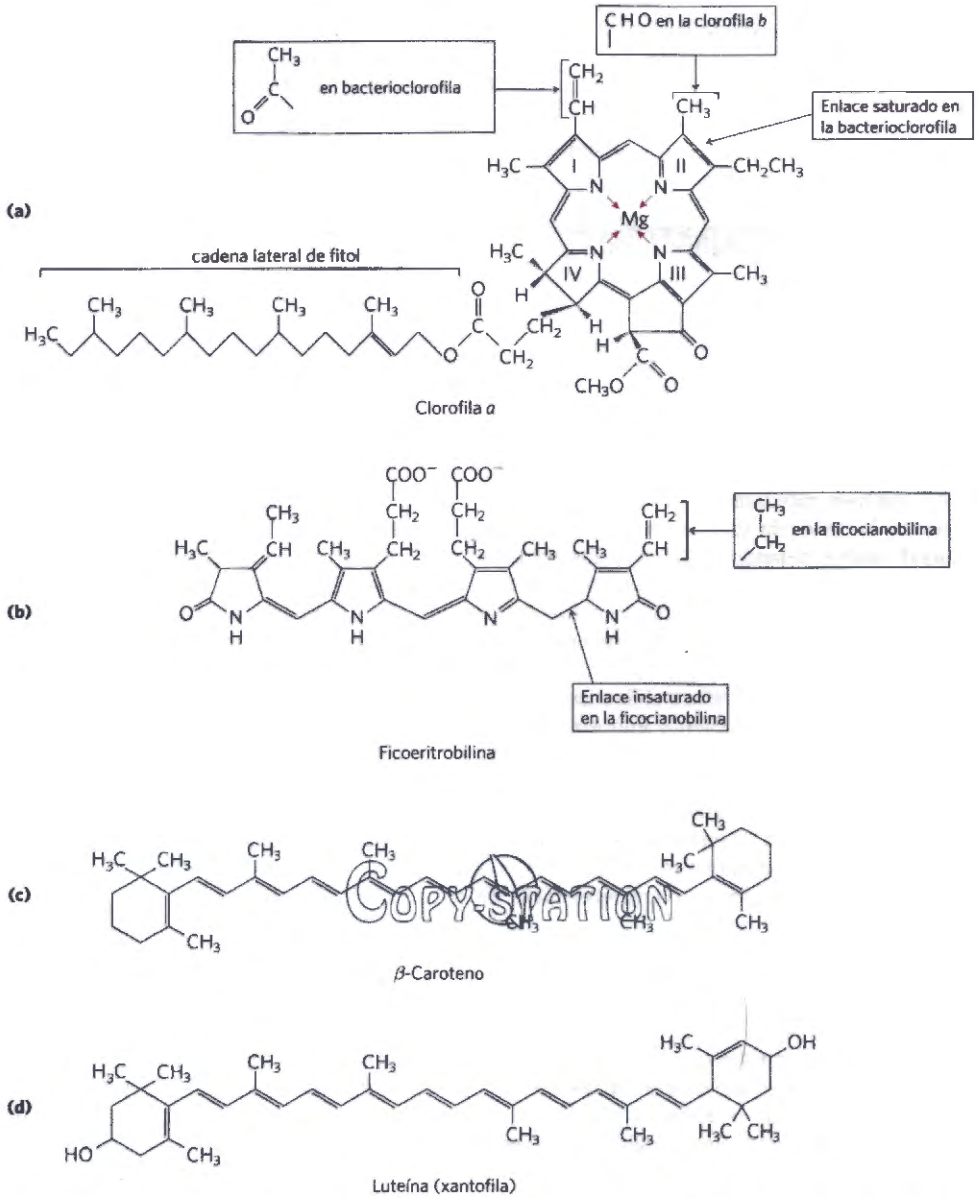


FIGURA 20-8 Fotopigmentos primarios y secundarios. (a) Las clorofilas *a* y *b* y la bacterioclorofila son los principales colectores de energía luminosa. **(b)** La ficoeritrobilina y la ficocianobilina (ficobilinas) son los pigmentos antena en cianobacterias y algas rojas. **(c)** El β-caroteno (un carotenoide) y **(d)** la luteína (una xantofila) son pigmentos accesorios en plantasLos sistemas conjugados (enlaces sencillos y dobles alternados) en estas moléculas justifican en gran parte la absorción de la luz visible.

La clorofila canaliza la energía absorbida a centros de reacción mediante transferencia de excitones

Los pigmentos de las membranas tilacoides que absorben luz están dispuestos en conjuntos funcionales denominados **fotosistemas**. En los cloroplastos de espinaca, por ejemplo, cada fotosistema contiene unas 200 moléculas de clorofila y unas 50 moléculas de carotenoides. Todas las moléculas de pigmento de un fotosistema pueden absorber fotones, pero sólo unas pocas moléculas de clorofila asociadas al **centro de reacción fotoquímico** están especializadas en transducir la energía luminosa en energía química. Las otras moléculas de pigmento de un fotosistema actúan como **moléculas antena**. Absorben energía luminosa y la transmiten rápida y eficientemente al centro de reacción **(Fig. 20-11)**. Unas moléculas forman parte de un complejo núcleo alrededor del centro de reacción. Otras forman **complejos de captaci´ de luz (LCH)** alrededor de la periferia del complejo núcleo. La clorofila y otros pigmentos se encuentran siempre asociados con proteínas de unión específicas que fijan los cromóforos en función de la relación que tienen entre sí, con otros complejos proteicos y con la membrana. Por ejemplo, dada monómero del complejo de captura de luz trimérico LHCH **(Fig. 20-12)** contiene siete moléculas de clorofila, cinco de clorofila *b* y dos de luteína.

Las moléculas de clorofila en los complejos captadores de luz y en otras proteínas fijadoras de clorofila, tienen propiedades de absorción de la luz que son sutilmente diferentes a las de la clorofila libre. Cuando se excitan por la luz moléculas de clorofila aisladas in vitro,

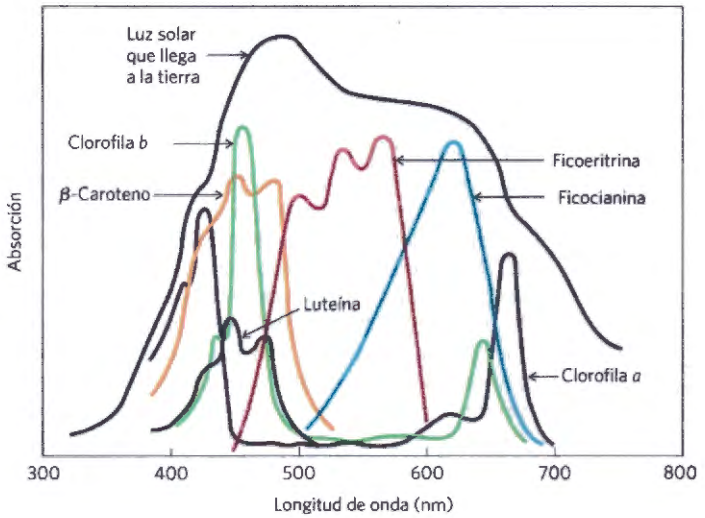


FIGURA 20-9 Absorción de la luz visible por fotopigmentos. Las plantas son verdes porque sus pigmentos absorben luz de las regiones roja y azul del espectro, dejando principalmente que la luz verde se refleje. Compare los espectros de absorción de los pigmentos con el espectro de la luz solar que alcanza la superficie de la tierra; la combinación de clorofilas (*a* y *b*) y pigmentos accesorios permite que las plantas capten la mayor parte de la energía disponible de la luz solar.

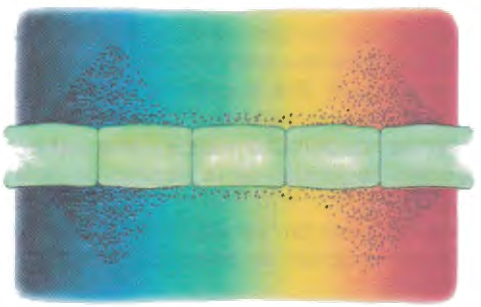
Las cantidades relativas de clorofilas y pigmentos accesorios son características para una especie dada de planta. La variación en la proporción de estos pigmentos es responsable de la gama de colores de los organismos fotosintéticos, desde el azul verdoso profundo de las agujas de la pícea, al color más verdoso de las hojas de arce, al color rojo, marrón o púrpura de algunas especies de algas multicelulares y de las hojas de algunas plantas decorativas.

la energía absorbida se libera rápidamente en forma de fluorescencia y calor, pero cuando se excita la clorofila por la luz visible en hojas intactas (**Fig. 20-13**, paso ❶, se observa muy poca fluorescencia. Lo que ocurre en su lugar es una transferencia directa de energía desde la clorofila antena excitada a una molécula de clorofila vecina, que queda excitada al tiempo que la primera molécula vuelve a su estado basal (paso ❷). Esta transferencia de energía, transferencia de excitones, se repite a un tercer, cuarto o posterior vecino hasta que se excita una de un par especial de moléculas de clorofila *a* en el centro de reacción fotoquímico (paso ❸). En esta molécula de clorofila excitada se promueve el paso de un electrón a un orbital de energía superior. Este electrón pasa a continuación a un aceptor electrónico vecino que forma parte de la cadena de transferencia electrónica, dejando la clorofila del centro de reacción con un electrón menos (un "hueco electrónico" indicado por + en la Fig. 20-13) (paso ❹). El aceptor electrónico adquiere una carga negativa en esta transacción. El electrón perdido por el par de moléculas de clorofila del centro de reacción es reemplazado por un electrón de una molécula dadora de electrones vecina (paso ❺), que queda, de este modo, cargada positivamente. De esta forma, *la excitación por la luz produce una separación de carga eléctrica e inicia una cadena de oxidación-reducción.*

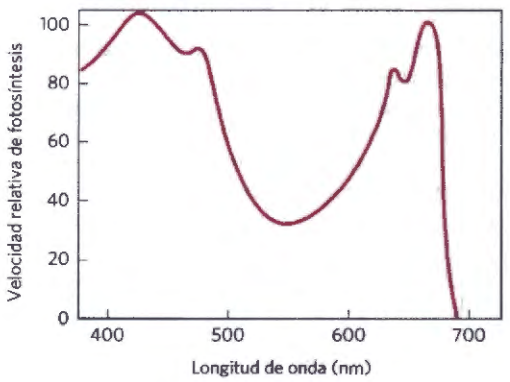
Copy Station

RESUMEN 20.1 Absorción de la luz

- La fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos de algas y plantas, estructuras dentro de dobles membranas y rellenas con un elaborado sistema de membranas tilacoides que contienen la maquinaria fotosintética.
- Las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis son las que dependen directamente de la absorción de la luz; la fotoquímica resultante toma electrones a partir del H_2O y los conduce a través de una serie de



(a)



(b)

FIGURA 20-10 Dos formas de determinar el espectro de acción de la fotosíntesis. **(a)** Resultados de un experimento clásico realizado por T.W. Englemann en 1882 para determinar qué longitud de onda de la luz era la más efectiva en promover la fotosíntesis. Englemann colocó células de un alga fotosintética filamentosa en el portaobjetos de un microscopio y la iluminó con luz de un prisma de modo que las células en una parte del filamento recibían principalmente luz azul, otras amarilla, otras roja. Para determinar qué células tenían una actividad fotosintética más importante también colocó en el portaobjetos bacterias que se sabe migran hacia regiones con alta concentración de O_2. Después de un período de iluminación la distribución de las bacterias demostró que los niveles de O_2 más elevados (producidos por la fotosíntesis) estaban en las regiones iluminadas con luz violeta y roja.

(b) Un experimento similar utilizando técnicas modernas (un electrodo de oxígeno) para la medición de la producción de O_2. Un espectro de acción, tal como se muestra aquí, describe la velocidad relativa de la fotosíntesis para la iluminación con un número constante de fotones de diferente longitud de onda. Tales espectros de acción son útiles porque sugieren (por comparación con espectros de absorción tales como los de la Fig. 20-9) qué pigmentos pueden canalizar la energía hacia la fotosíntesis.

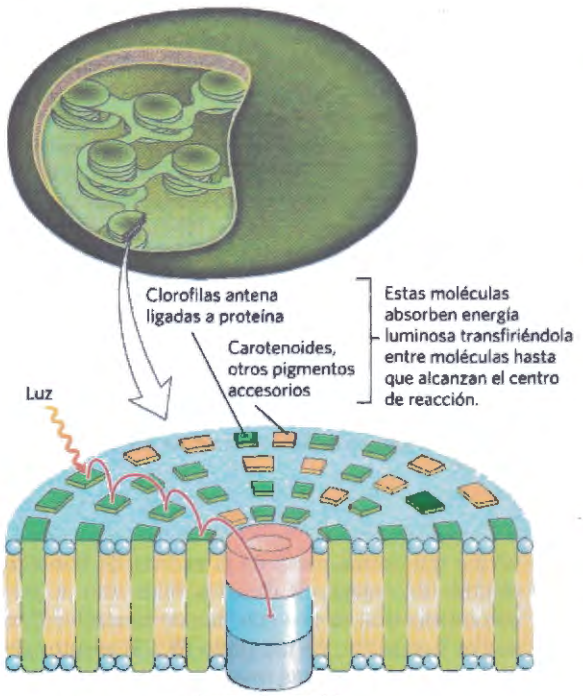


FIGURA 20-11 Organización de los fotosistemas en la membrana del tilacoide. Los fotosistemas están empaquetados de forma apretada en la membrana del tilacoide, con varios centenares de clorofilas antena y pigmentos accesorios rodeando un centro de fotorreacción. La absorción de un fotón por una cualquiera de las clorofilas antena origina la excitación del centro de reacción por transferencia de excitones (flecha roja). El complejo del citocromo b_6f y la ATP sintasa también se encuentran incrustados en la membrana del tilacoide (véase la Fig. 20-21).

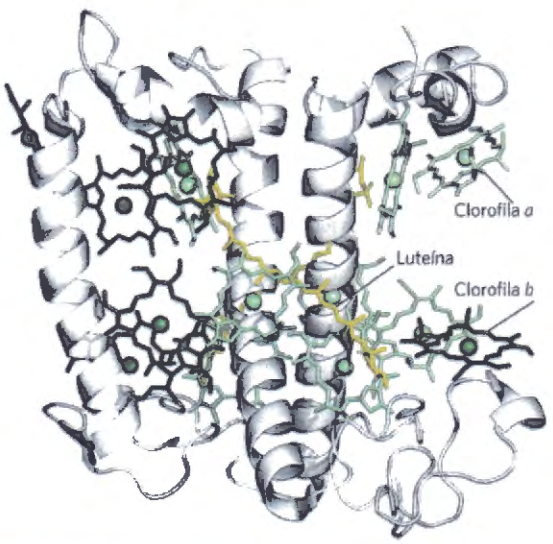


FIGURA 20-12 El complejo de captura de luz, LHCII. La unidad funcional es un trímero, con 36 moléculas de clorofila y seis moléculas de luteína. Se muestra aquí un monómero visto en el plano de la membrana con sus tres segmentos α-helicoidales transmembrana, siete moléculas de clorofila *a* (verde claro), cinco moléculas de clorofila *b* (verde oscuro) y dos moléculas de luteína (amarillo), que forman una abrazadera transversal interna. [Fuente: PDB ID 2BHW, J. Standfuss et al., *EMBO J.* 24:919, 2005].

transportadores ligados a la membrana, produciendo NADPH y ATP.

- Un fotón de luz visible posee energía suficiente para llevar a cabo reacciones fotoquímicas que, en los organismos fotosintéticos, conducen en última instancia a la síntesis de ATP.
- Las moléculas de clorofila están asociadas con proteínas en forma de complejos de captura de luz dispuestos alrededor de centros de reacción fotoquímicos.
- En plantas, la absorción de un fotón excita moléculas de clorofila y otros pigmentos (accesorios) que canalizan la energía hacia centros de reacción situados en las membranas tilacoides. En los centros de reacción la fotoexcitación da lugar a una separación de cargas que produce una especie que es un buen dador electrónico (agente reductor) y otra que es un buen aceptor electrónico.

20.2 Centros de reacción fotoquímicos

Determinar el sitio y la naturaleza de de la química impulsada por la luz en la fotosíntesis resultó ser un gran reto. Una razón de ello es la insolubilidad del aparato fotosintético; los principales protagonistas son proteínas integrales de membrana y, como la mayoría de proteínas de membrana, son difíciles de solubilizar y purificar. Un aspecto principal se reveló en 1952 cuando Louis Duysens descubrió que la iluminación de membranas fotosintéticas de la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum* con un pulso de luz de una longitud de onda específica (870 nm) originaba una disminución temporal en la absorción de la luz a aquella longitud de onda; un pigmento se había "decolorado" por la luz de 870 nm. Estudios posteriores realizados por Bessel Kok y Horst Witt mostraron decoloraciones similares de los pigmentos de los cloroplastos de plantas por la luz de 680 y 700 nm. Además, la adición del aceptor de electrones (no biológico) $[Fe(CN)^6]^{3-}$ (ferricianuro) originó la decoloración a esas longitudes de onda *sin iluminación previa*. Por lo tanto, la decoloración de los pigmentos se debía a la pérdida de un electrón de un centro de reacción fotoquímico. Estos pigmentos se designaron en función de la longitud de onda de máxima decoloración: P870, P680 y P700. Más tarde se descubrió que eran un "par especial" de moléculas de clorofila en el centro de reacción, a menudo denominado $(Chl)_2$.

Las bacterias fotosintéticas tienen dos tipos de centros de reacción

Las bacterias fotosintéticas poseen una maquinaria de fototransducción relativamente sencilla, con uno de entre dos tipos generales de centros de reacción. Uno de los tipos, encontrado en bacterias púrpura, pasa los electrones a través de la **feofitina** (clorofila que no contiene el ión Mg^{2+} central) a una quinona. El otro, en bacterias verdes del azufre, pasa los electrones a través de una quinona hasta un centro ferro-sulfurado. Las cianobacterias y las plantas tienen dos fotosistemas (PSI, PSII), uno de cada tipo, que actúan en tándem. Estudios bioquímicos y biofísicos han revelado muchos detalles moleculares de los centros de reacción de bacterias y cianobacterias que sirven, por tanto, como pro-

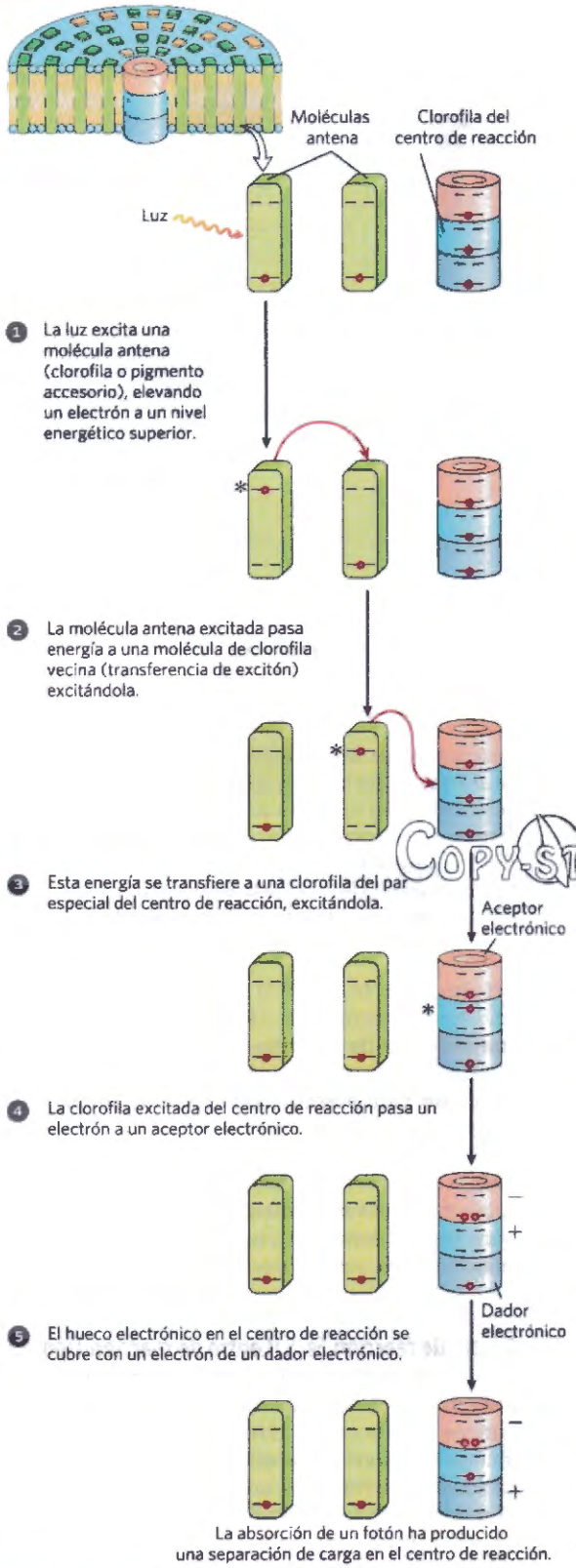


FIGURA 20-13 Transferencia de excitones y electrones. Este esquema generalizado muestra la conversión de la energía de un fotón absorbido en separación de cargas en el centro de reacción. Los pasos se describen detalladamente en el texto. Observe que el paso ❶ puede repetirse entre moléculas antena sucesivas hasta que el excitón alcanza el par especial de clorofilas del centro de reacción. Un asterisco (*) representa el estado excitado de una molécula antena.

totipos de los sistemas de fototransducción más complejos de las plantas superiores.

El centro de reacción feofitina-quinona (Centro de reacción Tipo II) La maquinaria fotosintética de las bacterias púrpura consta de tres módulos básicos **(Fig. 20-14)**: un único centro de reacción P870; un complejo citocromo bc_1 de transferencia de electrones similar al Complejo III de la cadena de transferencia electrónica mitocondrial, y una ATP sintasa, también similar a la de las mitocondrias. La iluminación impulsa los electrones a través de la feofitina y una quinona al complejo del citocromo bc_1; después de pasar por el complejo, los electrones vuelven al centro de reacción a través del citocromo c2, restableciendo su estado preiluminado. Este flujo cíclico de electrones impulsado por la luz proporciona la energía necesaria para el bombeo de protones por el complejo del citocromo bc1. Impulsada por el gradiente protónico resultante, la ATP sintasa produce ATP, exactamente igual que en la mitocondria (véase la Fig. 19-26).

Las estructuras tridimensionales de los centros de reacción de las bacterias púrpura (*Rhodopseudomonas viridis* y *Rhodobacter sphaeroides*), deducidas a partir de cristalografía de rayos X, dio respuestas sobre cómo se da la fototransducción en un centro de reacción feofitina-quinona. El centro de reacción de *R. viridis* **(Fig. 20-15a)** es un complejo proteico grande que contiene cuatro subunidades polipeptídicas, dos pares de clorofilas bacterianas, un par de feofitinas, dos quinonas, un hierro no hemo y cuatro hemos en el citocromo asociado del tipo *c*.

La secuencia de transferencias de electrones extremadamente rápida mostrada en la Figura 20-15b se ha deducido a partir de estudios físicos de los centros feofitina-quinona bacterianos, utilizando breves destellos de luz para provocar la fototransducción y una variedad de técnicas espectroscópicas para seguir el flujo de electrones a través de varios transportadores. Un par de moléculas de bacterioclorofila *a* $(Chl)_2$, el "par especial", constituye P870, el sitio donde se da la fotoquímica inicial del centro de reacción bacteriano. La energía de un fotón absorbido por una de las muchas moléculas de clorofila antena que rodean el centro de reacción llega a P870 por transferencia de excitones. Cuando estas dos moléculas de bacterioclorofila, tan cercanas que sus orbitales de enlace se solapan, absorben un excitón, el potencial redox de P870 se desplaza en una cantidad equivalente a la energía del fotón, convirtiendo el par especial en un dador electrónico muy fuerte. P870 cede un electrón que pasa a través de un monómero de clorofila vecino hacia la feofitina (Pheo). Ello produce dos radicales, uno cargado positivamente (el par especial, P870) y otro cargado negativamente (la feofitina):

$$P870 + 1\ \text{exciton} \longrightarrow P870^* \quad \text{(excitación)}$$
$$P870^* + \text{Pheo} \longrightarrow {}^{\bullet}P870^+ + {}^{\bullet}\text{Pheo}^- \quad \text{(separación de cargas)}$$

Ahora el radical de feofitina cede su electrón a una molécula de quinona unida fuertemente (Q_A), convirtiéndola en un radical semiquinona, que inmediatamente dona su electrón extra a una segunda quinona débil-

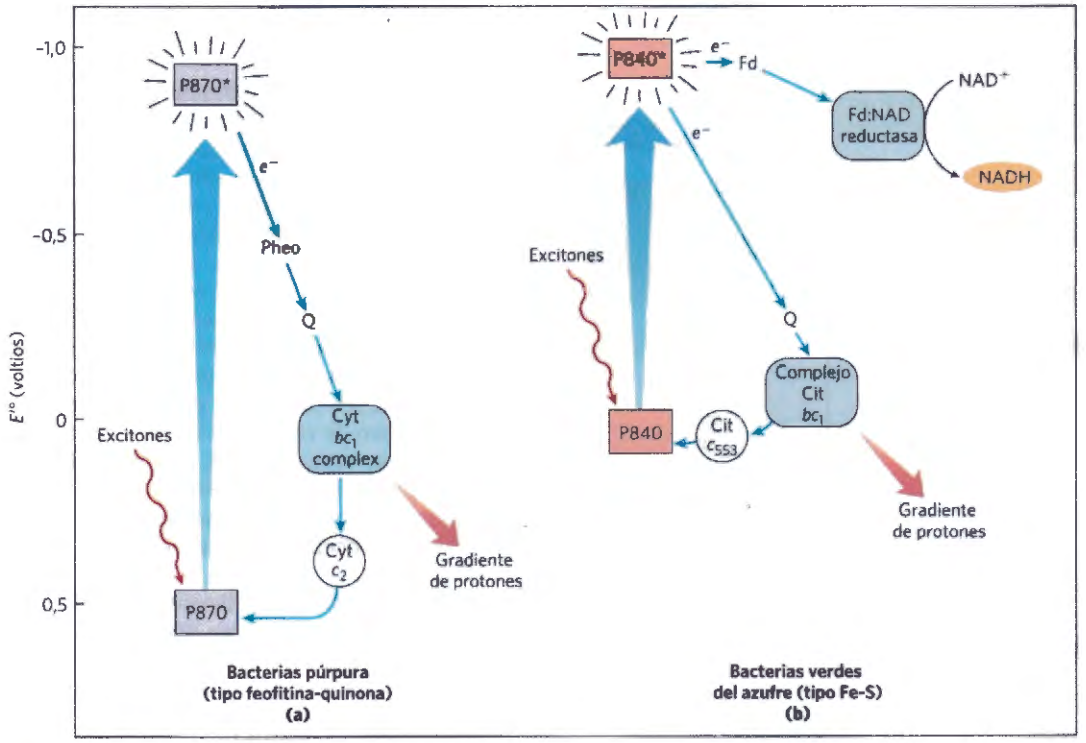


FIGURA 20-14 Módulos funcionales de la maquinaria fotosintética en bacterias púrpura y bacterias verdes del azufre. (a) En las bacterias púrpura, la energía luminosa impulsa los electrones desde el centro de reacción P870 a través de la feofitina (Pheo), una quinona (Q), y el complejo del citocromo bc_1; a continuación a través del citocromo $c_{2(2)}$ para volver al centro de reacción. El flujo de electrones a través del complejo del citocromo bc_1 genera el bombeo de protones, creando un potencial electroquímico que impulsa la síntesis de ATP. **(b)** Las bacterias verdes del azufre tienen dos rutas para los electrones impulsados por la excitación de P840: una ruta cíclica pasa a través de una quinona hacia el complejo del citocromo bc_1 y de vuelta al centro de reacción vía citocromo c_{553}, y una ruta no cíclica que pasa desde el centro de reacción a través de la proteína ferro-sulfurada ferredoxina (Fd), y a continuación al NAD^+ en una reacción catalizada por la ferredoxina: NAD reductasa.

COPYSTATION

mente ligada (Q_B). Dos transferencias electrónicas de este tipo convierten Q_B en su forma totalmente reducida, Q_BH_2, que puede difundir libremente por la bicapa de la membrana, alejándose del centro de reacción:

$$2\ {}^{\bullet}\text{Pheo}^- + 2H^+ + Q_B \longrightarrow 2\ \text{Pheo} + Q_BH_2$$
(reducción de la quinona)

La hidroquinona (Q_BH_2), que lleva en sus enlaces químicos parte de la energía de los fotones que inicialmente excitaron P870, pasa a formar parte de la reserva de quinona reducida (QH_2) disuelta en la membrana y se desplaza por la fase lipídica de la bicapa hacia el complejo del citocromo bc_1.

Al igual que el homólogo Complejo III de las mitocondrias, el complejo del citocromo bc_1 de las bacterias púrpura transporta electrones desde un dador quinol (QH_2) a un aceptor electrónico, utilizando la energía de la transferencia de electrones para bombear protones a través de la membrana, produciendo una fuerza protón-motriz. Se cree que la ruta del flujo de electrones a través de este complejo es muy parecida a la que pasa a través del Complejo III mitocondrial, implicando un ciclo Q (Fig. 19-11) en el que los protones se consumen en un lado de la membrana y se liberan en el otro. El aceptor electrónico final en las bacterias púrpura es la forma desprovista de electrones de P870, denominada ${}^{\bullet}P870^+$. Los electrones se desplazan desde el complejo del citocromo bc_1 al P870 vía un citocromo soluble del tipo c, el citocromo c_2 (Fig. 20-14a). El proceso de transferencia de electrones completa el ciclo, devolviendo el centro de reacción a su estado no decolorado, dispuesto para absorber otro excitón de una clorofila antena.

Una característica notable de este sistema es que toda la química tiene lugar en *estado sólido*, con las especies reactivas mantenidas muy próximas unas de otras con la orientación adecuada para la reacción. El resultado es una serie de reacciones muy rápidas y eficientes.

Centro de reacción Fe-S (Centro de reacción Tipo I) En la fotosíntesis en bacterias verdes del azufre intervienen los mismos tres módulos que en bacterias púrpura, aunque el proceso se diferencia en varios aspectos e incluye reacciones enzimáticas adicionales (Fig. 20-14b). La excitación hace que un electrón se desplace desde el centro de reacción hacia el complejo del citocromo bc_1 vía un transportador quinona. La transferencia electrónica a través de este complejo impulsa el transporte de protones y crea la fuerza protón-motriz necesaria para la síntesis de ATP, al igual que en las bacterias púrpura y en las mitocondrias. Sin embargo, a diferencia del flujo cíclico de electrones en las bacterias púrpura, algunos electrones fluyen desde el centro de reacción hacia una proteína ferro-sulfurada, la

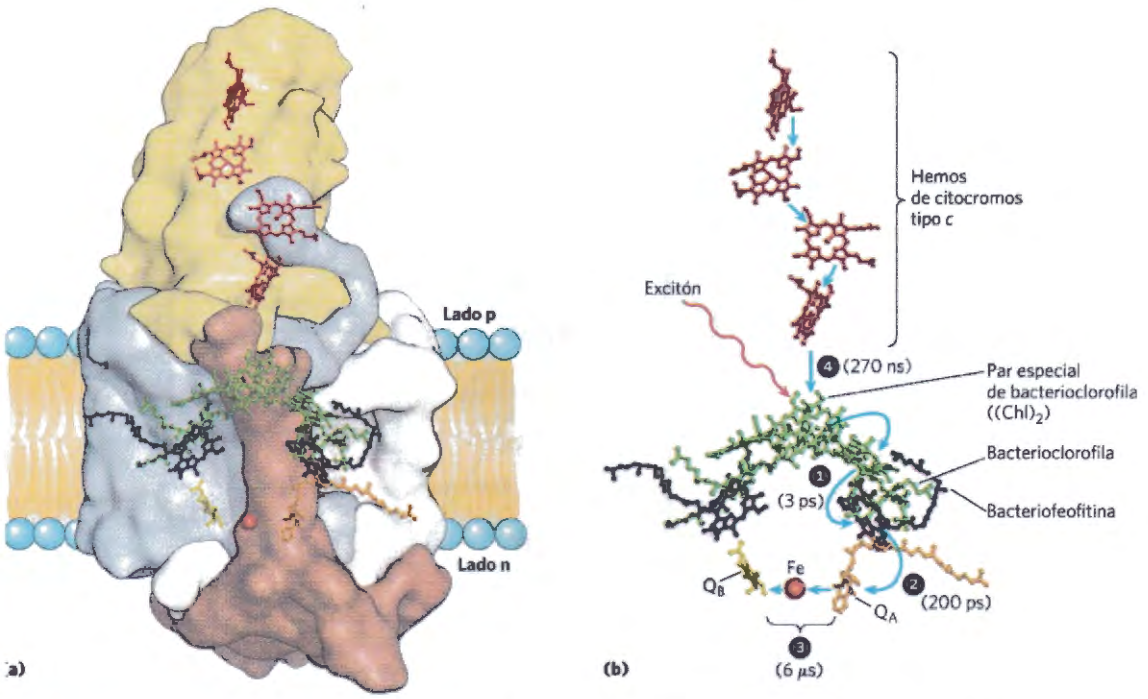


FIGURA 20-15 Centro de fotorreacción de la bacteria púrpura *Rhodopseudomonas viridis*. **(a)** El sistema tiene cuatro componentes: tres subunidades, H, M y L (marrón, azul y gris, respectivamente), con un total de 11 segmentos helicoidales transmembrana, y una cuarta proteína, el citocromo *c* (amarillo), asociada con el complejo en la superficie de la membrana. Las subunidades L y M son proteínas transmembrana emparejadas que juntas forman una estructura cilíndrica con una simetría aproximadamente bilateral a lo largo de su eje longitudinal. Los grupos prostéticos incrustados que participan en los acontecimientos fotoquímicos se muestran como sobre la superficie en **(a)** y separadamente en **(b)** como estructuras de bolas y varillas. Hay dos pares de moléculas de bacterioclorofila (verde) unidas a las cadenas L y M; uno de los pares (el "par especial", $(Chl)_2$ = P870) es el sitio donde se dan los primeros cambios fotoquímicos después de la absorción de la luz. También se incorporan al sistema un par de moléculas de feofitina (Pheo *a*) (azul); dos quinonas, menaquinona (Q_A) y ubiquinona (Q_B) (naranja y amarillo), también ordenadas con simetría bilateral; y un único Fe no hemo (rojo) localizado aproximadamente en el eje de simetría entre las quinonas. Los cuatro grupos hemo (rojo) asociados con el citocromo del tipo *c* del centro de reacción se muestran en la parte superior de la figura.

(b) Secuencia de acontecimientos que siguen a la excitación del par especial de bacterioclorofilas (todos los componentes tienen el mismo color que en (a)) con la escala de tiempo de las transferencias electrónicas entre paréntesis. ❶ El par especial excitado pasa un electrón a través de un monómero de bacterioclorofila a la feofitina, ❷ a partir de la cual el electrón se desplaza rápidamente a la menaquinona unida fuertemente, Q_A. ❸ Esta quinona transfiere electrones mucho más lentamente a la ubiquinona difundible, Q_B, a través del Fe no hemo. Mientras tanto, ❹ el "hueco electrónico" en el par especial se rellena con un electrón de un hemo del citocromo *c*. [Fuente: PDB ID 1PRC, J. Diesenhofer et al., *J. Mol. Biol.* 246:429, 1995].

ferredoxina, que entonces pasa los electrones vía **ferredoxina:NAD reductasa** al NAD^+, produciendo NADH. Los electrones tomados del centro de reacción para reducir el NAD^+ se reemplazan gracias a la oxidación de H_2S a S elemental y, a continuación, a SO_4^{2-}, en la reacción característica de las bacterias verdes del azufre. Esta oxidación de H_2S por las bacterias es químicamente análoga a la oxidación del H_2O por las plantas oxigénicas.

Factores cinéticos y termodinámicos evitan la disipación de energía por conversión interna

La compleja construcción de los centros de reacción es el resultado de la selección evolutiva hacia la eficiencia en el proceso fotosintético. El estado excitado P870* en principio podría decaer a su estado basal por conversión interna, un proceso muy rápido (10 picosegundos; 1 ps = 10^{-12} s) en el cual la energía del fotón absorbido se convierte en calor (movimiento molecular). Los centros de reacción están construidos para evitar la ineficiencia que resultaría de la conversión interna. Las proteínas del centro de reacción mantienen las bacterioclorofilas, bacteriofeofitinas y quinonas en una orientación fija entre ellas. Ello explica la gran eficiencia y rapidez de las reacciones; nada ha de colisionar por casualidad ni depende de una difusión al azar. La transferencia de excitones desde una clorofila antena hasta el par especial del centro de reacción se consigue en menos de 100 ps con una eficiencia >90%. A los 3 ps de la excitación de P870, la feofitina ha recibido un electrón y se convierte en un radical cargado negativamente; menos de 200 ps más tarde, el electrón ha llegado a la quinona Q_B (Fig. 20-15b). Las reacciones de transferencia electrónica no sólo son rápidas, sino que son termodinámicamente favorables; el par especial excitado P870* es un dador de electrones muy bueno (E'° = -1 V), y cada transferencia electrónica sucesiva es hacia un aceptor con E'o sustancialmente menos negativo. Por lo tanto, la variación en energía libre estándar del proceso es negativa y grande. Recuerde del Capítulo 13 que $\Delta G'^\circ = -n\Delta E'^\circ$, donde $\Delta E'^\circ$ es la

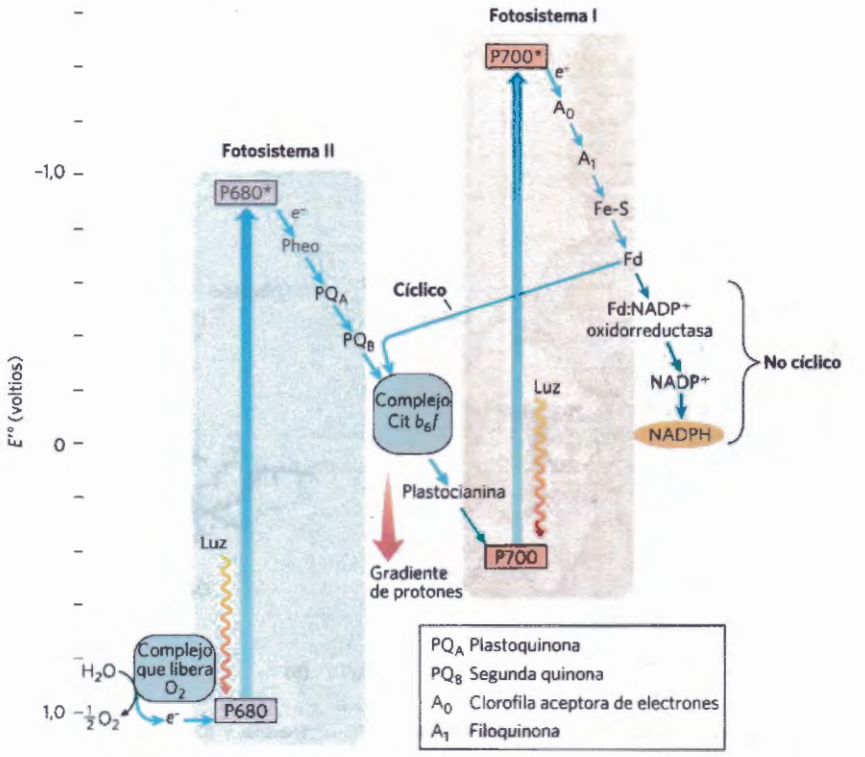


FIGURA 20-16 Integración de los fotosistemas I y II en cloroplastos. Este "esquema en Z" muestra la ruta de transferencia de electrones desde el H_2O (parte inferior izquierda) al NADP⁺ (derecha) en la fotosíntesis no cíclica. La posición de cada transportador electrónico sobre la escala vertical es un reflejo de su potencial de reducción estándar. Para elevar la energía de los electrones que proceden del H_2O al nivel de energía requerido para reducir el NADP⁺ a NADPH, cada electrón ha de ser "elevado" dos veces (flechas gruesas) por fotones absorbidos en PSII y PSI. Se requiere un fotón por cada electrón elevado en cada fotosistema. Después de la excitación, los electrones de alta energía fluyen "cuesta abajo" a través de la cadena de transportadores tal como se muestra. Durante la reacción de escisión del agua y durante la transferencia de electrones a través del complejo del citocromo b_6f, se transportan protones a través de la membrana del tilacoide produciendo el gradiente de protones que es crucial para la formación de ATP. Una ruta alternativa de electrones es la transferencia cíclica de electrones en la que los electrones pasan desde la ferredoxina de nuevo al complejo del citocromo b_6f en lugar de reducir el NADP⁺ a NADPH. La ruta cíclica produce más ATP y menos NADPH que la no cíclica.

Copy-station

diferencia entre los potenciales de reducción estándar de las dos medias reacciones:

$$(1)\ P870^* \longrightarrow {}^{\bullet}P870^+ + e^- \qquad E'^\circ = -1.0\ V$$

$$(2)\ Q + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow QH_2 \qquad E'^\circ = -0.045\ V$$

Así

$$\Delta E'^\circ = -0.045\ V - (-1.0\ V) \approx 0.95\ V$$

y

$$\Delta G'^\circ = -2(96.5\ kJ/V \cdot mol)(0.95\ V) = -180\ kJ/mol$$

La combinación de la cinética rápida con la termodinámica favorable hace que el proceso sea prácticamente irreversible y muy eficiente. El rendimiento energético global (porcentaje de la energía fotónica conservada en QH_2) es >30%; el resto de la energía se disipa en forma de calor y entropía.

En las plantas actúan en tándem dos centros de reacción

La maquinaria fotosintética de las cianobacterias, algas y plantas vasculares modernas es más compleja que los sistemas bacterianos de un único centro, y es muy probble que haya evolucionado a través de la combinación de dos fotocentros bacterianos más sencillos. Las membranas tilacoides de los cloroplastos tienen dos clases diferentes de fotosistemas, cada uno de ellos con su propio tipo de centro de reacción fotoquímico y un conjunto de moléculas antena. Los dos sistemas tienen funciones distintas y complementarias (**Fig. 20-16**). El **fotosistema II (PSII)** es un sistema tipo feofitina-quinona (como el fotosistema único de las bacterias púrpura) que contiene cantidades aproximadamente iguales de clorofilas *a* y *b*. La excitación del par especial del centro de reacción P680 impulsa electrones a través del complejo del citocromo b_6f con el movimiento concomitante de protones a través de la membrana del tilacoide. El **fotosistema I (PSI)** está estructural y funcionalmente relacionado con el centro de reacción tipo I de las bacterias verdes del azufre. Tiene un centro de reacción P700 y una elevada proporción de clorofila *a* respecto *a* clorofila *b*. El P700 excitado pasa electrones a través de una cadena de transportadores a la proteína Fe-S ferredoxina, y a continuación al NADP⁺, produciendo NADPH. Las membranas de los tilacoides de un solo cloroplasto de espinaca tienen muchos centenares de cada clase de fotosistema.

Estos dos centros de reacción presentes en plantas actúan en tándem para catalizar el movimiento de electrones impulsado por la luz desde el H_2O hasta el NADP⁺. Los electrones son transportados entre los dos

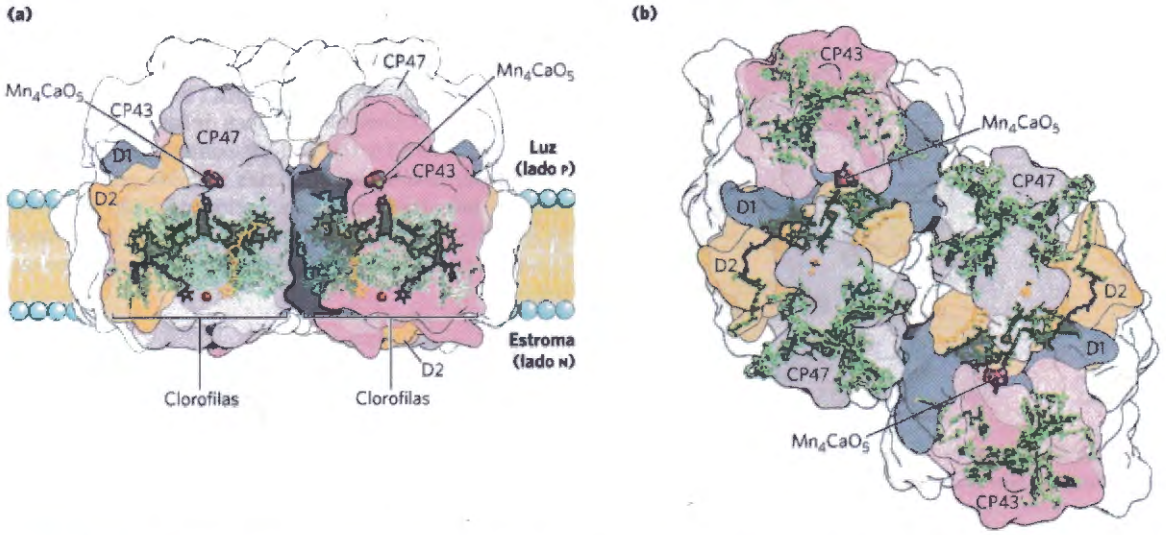


FIGURA 20-17 Estructura del fotosistema II de la cianobacteria *Thermosynechococcus vulcanus*. Esta estructura, determinada por cristalografía de rayos X, está vista **(a)** en el plano de la membrana y **(b)** desde la luz del tilacoide (lado P). El enorme complejo es un dímero, en el que cada monómero tiene su propio centro de reacción. CP43 y CP47 son proteínas fijadoras de clorofila que forman la antena núcleo, directamente asociada con las proteínas D1 y D2 del centro de reacción PSII. Cada monómero PSII contiene 35 clorofilas, 2 feofitinas, 11 β-carotenos, 2 plastoquinonas, 1 citocromo de tipo *b* y 1 citocromo de tipo *c*, 1 hierro no hemo y 1 complejo Mn_4CaO_5. [Fuente: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 475:55, 2011].

fotosistemas por la proteína soluble **plastocianina**. Las cianobacterias y las plantas oxidan H_2O (del mismo modo que las bacterias verdes del azufre oxidan H_2S) para reemplazar los electrones que se trasladan del PSII al PSI y finalmente al $NADP^+$, con lo que se produce O_2 (Fig. 20-16, parte inferior izquierda). Este proceso se conoce como **fotosíntesis oxigénica** para distinguirlo de la fotosíntesis anoxigénica de las bacterias púrpura y verdes del azufre. Todas las células fotosintéticas que desprenden O_2 (las de plantas, algas y cianobacterias) contienen PSI y PSII; los organismos con un único fotosistema no desprenden O_2. El diagrama de la Figura 20-16, a menudo llamado **esquema en Z** debido a su forma global, representa la ruta del flujo electrónico entre los dos fotosistemas así como las relaciones energéticas de las reacciones dependientes de la luz. De este modo, el esquema en Z describe la ruta completa por la que fluyen electrones desde el H_2O al $NADP^+$, según la ecuación:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8 \text{ fotones} \longrightarrow O_2 + 2NADPH + 2H^+$$

Se transfiere un electrón desde el H_2O al $NADP^+$, por cada dos fotones absorbidos (uno por cada fotosistema). Para formar una molécula de O_2, que requiere la transferencia de cuatro electrones desde dos H_2O a dos $NADP^+$, se ha de absorber un total de ocho fotones, cuatro para cada fotosistema.

Fotosistema II PSII es dimérico **(Fig. 20-17)**. Cada monómero es un enorme complejo de 19 proteínas, incluidas las proteínas D1 y D2 del complejo núcleo del

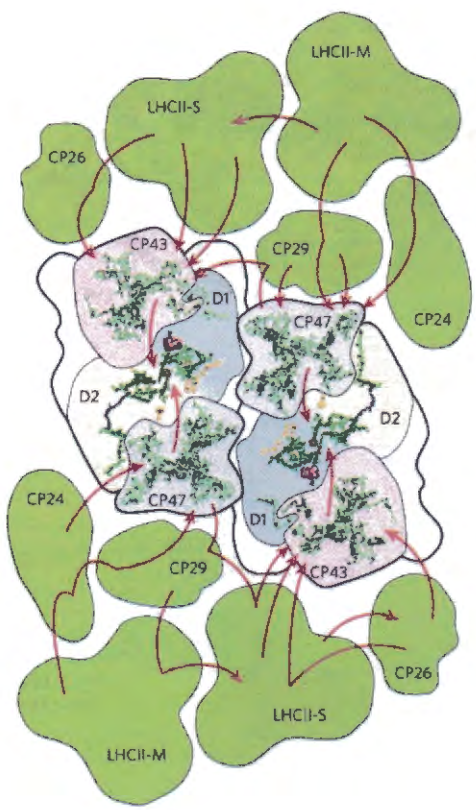


FIGURA 20-18 Ruta de los excitones a través del fotosistema II. El centro de reacción está rodeado por varios complejos antena débilmente asociados cada uno de los cuales contiene muchas moléculas de clorofila y de otros pigmentos. CP43 y CP47 forman la antena núcleo; CP26, CP29 y CP24 y los complejos triméricos de captura de luz LHCII-M y LHCII-S forman la antena exterior. Cuando un fotón excita una de entre estas muchas clorofilas antena, el excitón resultante se desplaza (flechas rojas) de clorofila a clorofila hasta que llega a P870, el par especial de clorofilas del centro de reacción en las proteínas transmembrana D1 y D2. [Fuente: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011].

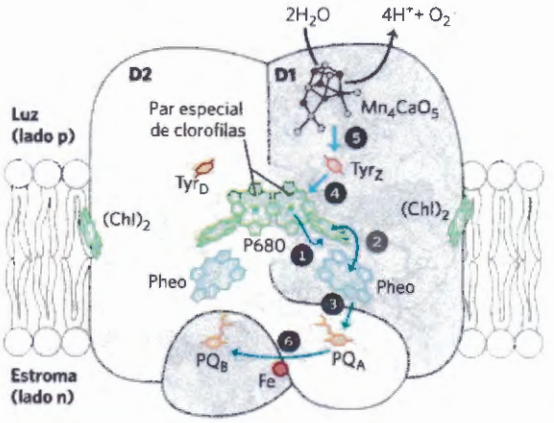


FIGURA 20-19 Flujo de electrones a través del fotosistema II de la cianobacteria *Synechococcus elongatus*. La forma monomérica del complejo núcleo mostrada aquí tiene dos proteínas transmembrana principales, D1 y D2, cada una con su conjunto de transportadores de electrones. Aunque las dos subunidades son casi simétricas, el flujo electrónico sólo tiene lugar a través de una de las dos ramas de transportadores de electrones, la de la derecha (en D1). Las flechas muestran la ruta del flujo de electrones desde el agrupamiento iónico Mn_4CaO_5 del enzima de escisión del agua a la quinona PQ_B. Los procesos fotoquímicos transcurren según la secuencia indicadas por los números de etapa. Observe la gran similitud entre las posiciones de los transportadores de electrones aquí y las posiciones en el centro de reacción fotoquímico bacteriano mostrado en la Figura 20-15. La función de los residuos Tyr y la estructura del agrupamiento Mn_4CaO_5 se discuten más adelante (véase la Fig. 20-24b).

centro de reacción P680: dos proteínas fijadoras de clorofila, CP43 y CP47 y cromóforos asociados entre los que se incluyen carotenoides, un hierro no hemo y el complejo inorgánico Mn_4CaO_5. Dieciséis de las proteínas de PSII contienen segmentos transmembrana, y tres son proteínas periféricas en el lado de la luz que estabilizan el complejo Mn_4CaO_5. Alrededor de PSII hay proteínas fijadoras de clorofila adicionales y complejos de captura de luz. Cuando se absorbe un fotón por cualquiera de estas moléculas antena, el excitón resultante se desplaza muy rápidamente de uno a otro de los pigmentos hasta que alcanza el centro de reacción y excita P680, el par especial de moléculas de clorofila *a* (Chl *a*)$_2$, para iniciar la fotoquímica **(Fig. 20-18)**.

Los detalles mecanísticos de las reacciones fotoquímicas en PSII y PSI son básicamente similares a los del fotosistema de las bacterias púrpura con varias adiciones importantes. La excitación de P680 en PSII **(Fig. 20-19)** genera P680*, un excelente dador de electrones que, en un tiempo de picosegundos, transfiere un elec-

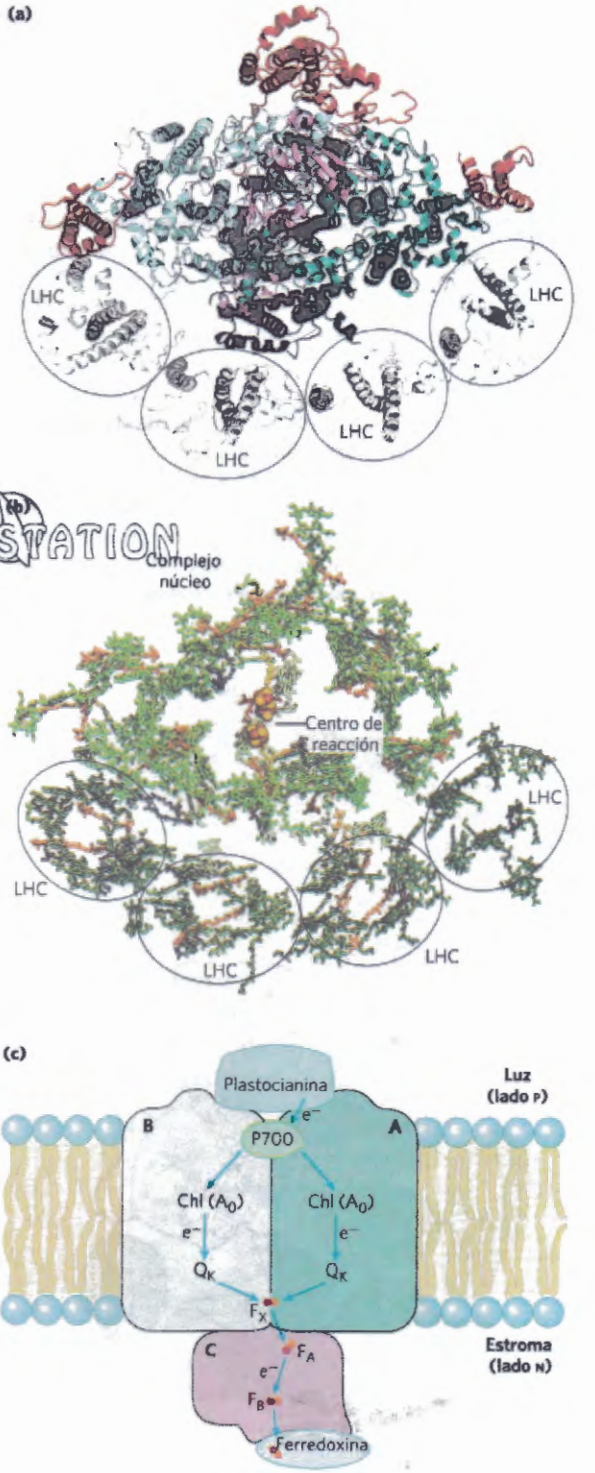


FIGURA 20-20 Estructura del fotosistema I de una planta y flujo electrónico a través del sistema. El fotosistema I es un trímero simétrico. Aquí se muestra un monómero del fotosistema I del guisante, *Pisum sativum*, visto desde el lado del estroma en **(a)** y en **(b)**. **(a)** Subunidades proteicas del centro de reacción y complejos de captura de luz **(b)** Los cromóforos. Las moléculas de clorofila del complejo núcleo se muestran en verde claro, las de LHCI en verde oscuro y las clorofilas que abarcan el hueco entre los complejos de captura de luz y el centro de reacción en verde oliva. Los lípidos son grises y los carotenoides naranja. **(c)** La ruta de los electrones (flechas azules) a través de PSI, vista en el plano de la membrana. Cuando se excita P700, el par especial de clorofilas, por un fotón o excitón, su potencial de reducción disminuye de modo espectacular, convirtiéndolo en un buen dador electrónico. A continuación, P700 pasa un electrón a través de una clorofila próxima (denominada A_0) a la filoquinona (Q_K).]La Q_K reducida se reoxida a medida que pasa dos electrones, de uno en uno, a un centro Fe-S (F_X) cerca del lado N de la membrana. Desde F_X, los electrones se desplazan a través de otros dos centros Fe-S (F_A y F_B), a la ferredoxina del estroma. La ferredoxina cede entonces electrones al $NADP^+$ (no mostrado) reduciéndolo a NADPH, una de las formas en las que se capta la energía de los fotones en los cloroplastos. [Fuente: (a, b) PDB ID 4RKU, Y. Mazor et al.,]

trón a la feofitina, dándole una carga negativa ($^{-}$Pheo^{-}). Con la pérdida de su electrón, el P680* se transforma en un radical catiónico, P680^{+}. $^{-}$Pheo^{-} pasa muy rápidamente su electrón extra a una **plastoquinona, PQ_A** (Q_A), unida a una proteína que a su vez pasa su electrón a otra plastoquinona, PQ_B (Q_B) unida más débilmente. Cuando PQ_B ha adquirido dos electrones en dos transferencias de este tipo a partir de PQ_A y dos protones del agua disolvente, se encuentra en su forma quinol totalmente reducida, PQ_BH_2. La reacción global iniciada por la luz en PSII es,

$$4\ P680 + 4H^+ + 2\ PQ_B + 4\ \text{fotones} \longrightarrow 4\ P680^+ + 2\ PQ_BH_2 \quad (20\text{-}1)$$

Finalmente, los electrones de PQBH2 pasan a través del complejo del citocromo b_6f (Fig. 20-16). El electrón eliminado inicialmente de P680 es reemplazado por un electrón obtenido de la oxidación del agua, tal como se describe más adelante. El sitio de unión de la plastoquinona es el punto de acción de muchos herbicidas comerciales que matan plantas bloqueando la transferencia electrónica a través del complejo del citocromo b_6f e impiden la producción fotosintética de ATP.

Fotosistema I PSI y sus moléculas antena forman parte de un complejo supramolecular compuesto por, al menos, 16 proteínas entre las que se incluyen cuatro proteínas de unión de clorofila dispuestas alrededor de la periferia del centro de reacción **(Fig. 20-20)**. El complejo también incluye 35 carotenoides de diversos tipos, tres agrupamientos 4Fe-4S y dos filoquinonas. Los transportadores electrónicos del centro de reacción están firmemente integrados con clorofilas antena. El resultado es que la transferencia de excitón desde las clorofilas antena al centro de reacción es rápida y eficiente.

Los acontecimientos fotoquímicos que siguen a la excitación de PSI en el centro de reacción P700 (Fig. 20-20c) son formalmente parecidos a los de PSII. El centro de reacción excitado P700* cede un electrón a un aceptor, A_0^- (una molécula de clorofila *a*, funcionalmente homóloga a la feofitina de PSII), generando A_0^- y P700^{+}. Una vez más, la excitación genera la separación de cargas en el centro de reacción fotoquímico. P700^{+} es un agente oxidante fuerte, que capta rápidamente un electrón de la plastocianina, una proteína soluble transportadora de electrones que contiene Cu. A_0^- es un agente reductor excepcionalmente fuerte que pasa su electrón a través de una cadena de transportadores que llega finalmente al NADP^{+} (Fig. 20-16, lado derecho). La **filoquinona (Q_K)** acepta el electrón y lo cede a una proteína ferro-sulfurada (a través de tres centros Fe-S de PSI). A partir de este punto, el electrón pasa a la ferredoxina (Fd), otra proteína ferro-sulfurada asociada débilmente a la membrana del tilacoide. Recuerde que la ferredoxina de espinaca (Mr 10.700) contiene un centro 2Fe-2S (Fig. 19-5) que experimenta reacciones de oxidación y reducción de un electrón. El cuarto transportador electrónico de la cadena es la flavoproteína **ferredoxina:NADP^{+} oxidorreductasa**, que transfiere electrones desde la ferredoxina reducida (Fd_{red}) al NADP^{+}:

$$2Fd_{red} + 2H^+ + NADP^+ \longrightarrow 2Fd_{ox} + NADPH + H^+$$

Este enzima es homólogo a la ferredoxina:NAD reductasa de las bacterias verdes del azufre (Fig. 20-14b).

El complejo del citocromo b_6f une los fotosistemas II y I

Los electrones almacenados temporalmente en el plastoquinol como resultado de la excitación de P680 del PSII se transportan a P700 de PSI mediante el complejo del citocromo b_6f y la proteína soluble plastocianina (Fig. 20-16, centro). Al igual que el Complejo III de la mitocondria, el complejo del citocromo b_6f **(Fig. 20-21)** contiene un citocromo del tipo *b* con dos grupos hemo (denominados b_H y b_L), una proteína ferro-sulfurada de Rieske (M_r 20.000) y el citocromo *f* (del latín *frons*, que significa "hoja"). Los electrones fluyen a través del complejo del citocromo b_6f desde el PQ_BH_2 al citocromo *f*, seguidamente a la plastocianina, y finalmente a P700^{+}, reduciéndolo.

Al igual que el Complejo III de la mitocondria, el citocromo b_6f traspasa los electrones de una quinona reducida, un transportador de dos electrones móvil y liposoluble (Q en mitocondria, PQ_B en cloroplastos), a una proteína hidrosoluble que transporta un electrón (citocromo c en la mitocondria, plastocianina en los cloroplastos). Como en las mitocondrias, en la función de este complejo interviene un ciclo Q (Fig. 19-11) en el que los electrones pasan, de uno en uno, desde PQ_BH_2 al citocromo b_6. Como resultado de este ciclo se bombean protones a través de la membrana; en los cloroplastos, la dirección del movimiento protónico es desde el compartimiento del estroma a la luz del tilacoide. Hasta cuatro protones entran en la luz por cada par de electrones que pasan a través del complejo del citocromo b_6f. El resultado es la producción de un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide a medida que pasan los electrones desde PSII a PSI. Dado que el volumen de la luz aplanada del tilacoide es pequeño, la entrada de un número pequeño de protones tiene un efecto relativamente grande sobre el pH de la luz. La diferencia de pH determinada entre el estroma (pH 8) y la luz del tilacoide (pH 5) representa una diferencia de 1.000 veces en la concentración de protones, una importante fuerza motriz para la síntesis de ATP.

El flujo cíclico de electrones entre PSI y el complejo del citocromo b_6f aumenta la producción de ATP en relación a la de NADPH

La ruta lineal de electrones desde el agua al NADP produce un gradiente de protones, que se utiliza para impulsar la síntesis de ATP, y NADPH, que se utiliza en los procesos biosintéticos reductores. Este desplazamiento lineal de electrones se denomina **flujo electrónico no cíclico** para diferenciarlo de su alternativa, **flujo electrónico cíclico**. En el flujo electrónico cíclico sólo interviene PSI y no interviene PSII (Fig. 20-16). Los electrones que pasan desde P700 a la ferredoxina no continúan hasta el NADP^{+} sino que vuelven a la plastocianina a través del complejo b_6f. (La vía que siguen los electrones es similar a la de las bacterias verdes del azufre mostrada en la Fig. 20-14b). La plastocianina cede entonces electrones al P700 que los transfiere a la ferredoxina. Así los electrones se ciclan continuamente a través del coruplejo del citocromo b_6f y del centro de

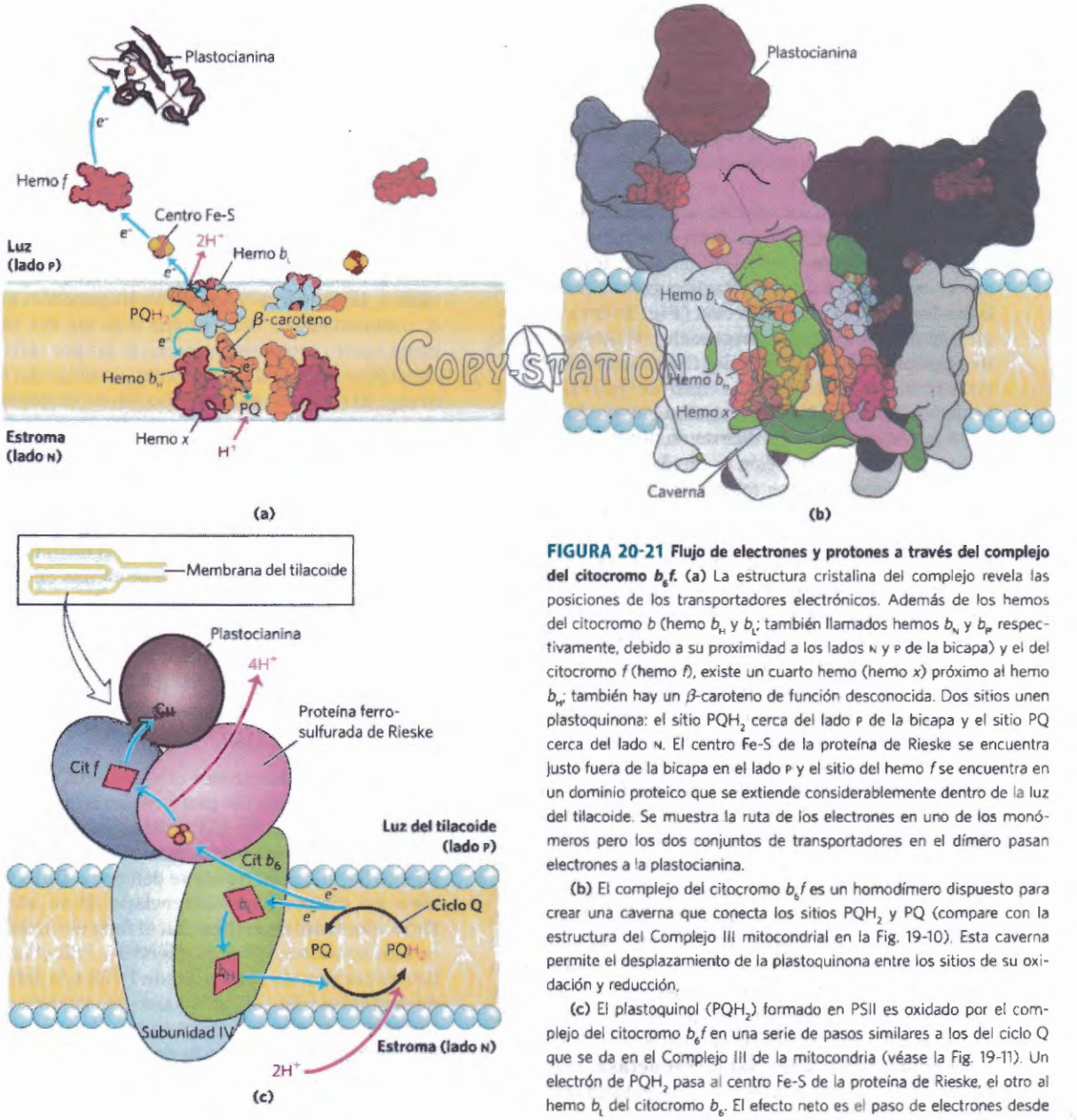
reacción de PSI siendo cada electrón impulsado alrededor del ciclo por la energía de un fotón. El flujo electrónico cíclico no va acompañado de la formación neta de NADPH ni del desprendimiento de O_2. No obstante, sí va acompañado del bombeo de protones por el complejo del citocromo b_6f y de la fosforilación del ADP a ATP, lo que se conoce como **fotofosforilación cíclica**. La ecuación global para el flujo cíclico de electrones y fotofosforilación es simplemente

$$ADP + P_i \xrightarrow{luz} ATP + H_2O$$

Al regular el reparto de electrones entre la reducción del $NADP^+$ y la fotofosforilación cíclica, una planta ajusta la proporción de ATP a NADPH producidos en las reacciones dependientes de la luz para cubrir sus necesidades de estos productos en las reacciones de fijación de carbono y en otros procesos biosintéticos. Tal como veremos en la Sección 20.5), las reacciones de asimilación de carbono necesitan ATP y NADPH en la relación 3:2. Esta regulación de las rutas de transferencia de electrones constituye una parte de una adaptación a corto plazo a los cambios en el color (longitud de onda) y cantidad (intensidad) de la luz, tal como se describe más adelante.

Transiciones de estado cambian la distribución de LHCII entre los dos fotosistemas

Los vegetales están expuestos a luz de intensidad y longitud de onda muy variables a lo largo de un día o de

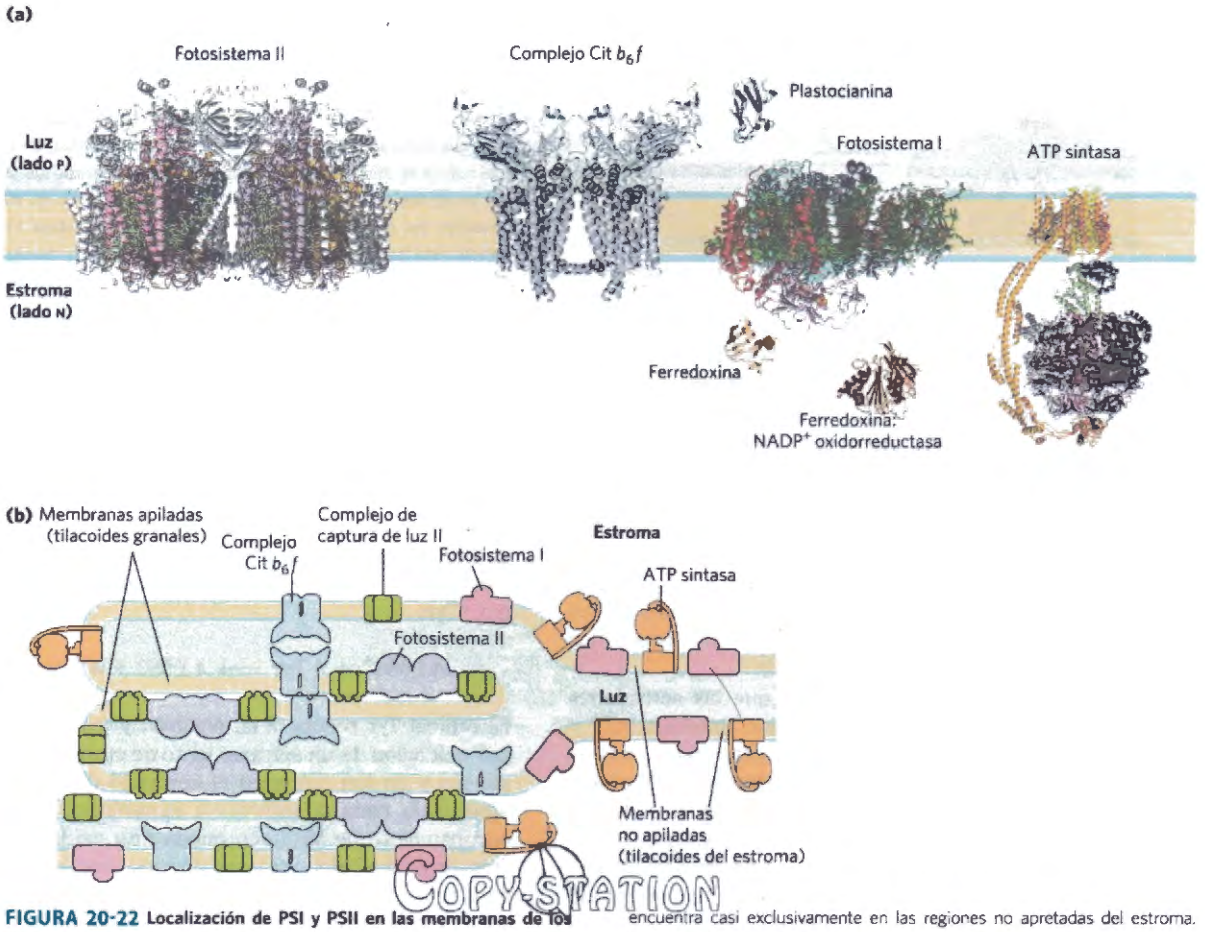


COPY-STATION

FIGURA 20-21 Flujo de electrones y protones a través del complejo del citocromo b_6f. **(a)** La estructura cristalina del complejo revela las posiciones de los transportadores electrónicos. Además de los hemos del citocromo *b* (hemo b_H y b_L; también llamados hemos b_N y b_P, respectivamente, debido a su proximidad a los lados N y P de la bicapa) y el del citocromo *f* (hemo *f*), existe un cuarto hemo (hemo *x*) próximo al hemo b_H; también hay un β-caroteno de función desconocida. Dos sitios unen plastoquinona: el sitio PQH_2 cerca del lado P de la bicapa y el sitio PQ cerca del lado N. El centro Fe-S de la proteína de Rieske se encuentra justo fuera de la bicapa en el lado P y el sitio del hemo *f* se encuentra en un dominio proteico que se extiende considerablemente dentro de la luz del tilacoide. Se muestra la ruta de los electrones en uno de los monómeros pero los dos conjuntos de transportadores en el dímero pasan electrones a la plastocianina.

(b) El complejo del citocromo b_6f es un homodímero dispuesto para crear una caverna que conecta los sitios PQH_2 y PQ (compare con la estructura del Complejo III mitocondrial en la Fig. 19-10). Esta caverna permite el desplazamiento de la plastoquinona entre los sitios de su oxidación y reducción.

(c) El plastoquinol (PQH_2) formado en PSII es oxidado por el complejo del citocromo b_6f en una serie de pasos similares a los del ciclo Q que se da en el Complejo III de la mitocondria (véase la Fig. 19-11). Un electrón de PQH_2 pasa al centro Fe-S de la proteína de Rieske, el otro al hemo b_L del citocromo b_6. El efecto neto es el paso de electrones desde PQH_2 a la proteína soluble plastocianina, que los transporta a PSI. [Fuentes: (a, b) PDB ID 1FV5, G. Kurisu et al., *Science* 302:1009, 2003; PDB ID 2Q5B, Y. S. Bukhman-DeRuyter et al.,]



COPY-STATION

FIGURA 20-22 Localización de PSI y PSII en las membranas de los tilacoides. **(a)** Estructuras de los complejos y proteínas solubles del aparato fotosintético de una planta vascular o de un alga, dibujados a la misma escala. Se muestra la ATP sintasa bovina. **(b)** El complejo de captura de luz LHCII y la ATP sintasa se localizan tanto en las regiones apretadas de la membrana del tilacoide (tilacoides granales en las que varias membranas están en contacto) como en las no apretadas (tilacoides del estroma) y tienen acceso directo al ADP y al $NADP^+$ del estroma. El PSII se encuentra casi exclusivamente en las regiones granales apretadas, mientras que el PSI se encuentra casi exclusivamente en las regiones no apretadas del estroma. LHCII es el «pegamento» que mantiene juntas las membranas tilacoides (véase la Fig. 20-23). [Fuentes: **(a)** PSII: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011; cit b_6f: PDB ID 2E74, E. Yamashita et al., *J. Mol. Biol.* 370:39, 2007; plastocianina: PDB ID 1AG6, Y. Xue et al., *Protein Sci.* 7:2099, 1998; PSI: 4RKU, Y. Mazor et al.,; ferredoxina: PDB ID 1A70, C. Binda et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54:1353, 1998; ferredoxina:NADP reductasa: PDB ID 1QG0, Z. Deng et al., *Nature Struct. Biol.* 6:847, 1999; ATP sintasa: PDB ID 5ARA, A. Zhou et al., *eLife* 4:e10180, 2015].

una estación y, aunque pueden alterar algo sus patrones de crecimiento, no pueden arrancarse de raíz y desplazarse para optimizar su exposición a la luz. En lugar de ello, han evolucionado mecanismos celulares que permiten a las plantas acomodarse a las condiciones cambiantes de luz. La energía necesaria para excitar PSI (P700) es menor que la requerida para excitar PSII (P680) (a menor longitud de onda de la luz mayor energía). En el caso de que PSI y PSII fuesen contiguos, los excitones que se originaran en el sistema antena de PSII migrarían hacia el centro de reacción de PSI, dejando PSII por debajo del estado de excitación de manera crónica, lo que interferiría con la operación del sistema de dos centros. Este desequilibrio en el suministro de excitones se evita gracias a la separación de los dos fotosistemas en la membrana del tilacoide **(Fig. 20-22)**. PSII se localiza casi exclusivamente en las pilas de membranas estrechamente empaquetadas de tilacoides granales; su complejo de captura de luz (LHCII) asociado facilita la fuerte asociación de membranas adyacentes de los grana. PSI y el complejo de la ATP sintasa se localizan casi exclusivamente en las membranas de los tilacoides estromales no apiladas, donde tienen acceso al contenido del estroma, incluidos ADP y $NADP^+$. El complejo del citocromo b6f está presente principalmente en los grana.

La asociación de LHCII con PSI y PSII depende de la intensidad y longitud de onda de la luz, que pueden cambiar a corto plazo, lo que lleva a **transiciones de estado** en el cloroplasto. En el estado 1, LHCII, PSII y PSI están dispuestos para maximizar la captura de energía luminosa. Un residuo Ser crítico en LHCII que no está fosforilado, y LHCII se asocia a PSII. En condiciones de luz intensa o azul, que favorecen la absorción por PSII este fotosistema reduce la plastoquinona a plastoquinol (PQH_2) más rápidamente de lo que PSI pueda oxidarlo. La acumulación resultante de PQH_2 activa una proteína quinasa que desencadena la transición al estado 2 al fosforilar un residuo Thr de LHCII **(Fig. 20-23)**. La fosforilación debilita la interacción de LHCII con la membrana y con PSII; parte de LHCII se disocia y se desplaza hacia los tilacoides del estroma. Aquí captura

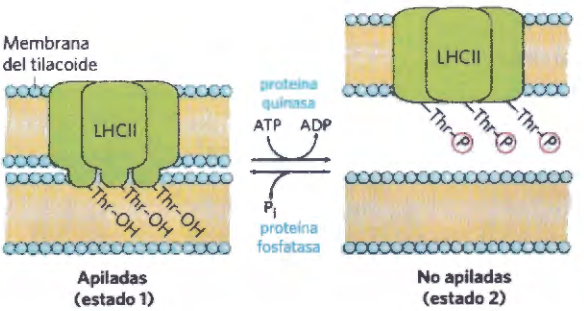


FIGURA 20-23 Equilibrio del flujo de electrones en PSI y PSII por transición de estado. En los tilacoides granales un dominio hidrofóbico de LHCII en una lamela de los tilacoides se inserta en la membrana vecina y mantiene las dos membranas en yuxtaposición (estado 1). La acumulación de plastoquinol (no mostrada) estimula una proteína quinasa que fosforila un residuo Thr del dominio hidrofóbico de LHCII, lo cual reduce su afinidad por la membrana vecina, convirtiendo las regiones apretadas de los tilacoides granales en regiones no apretadas de tilacoides del estroma (estado 2). Una proteína fosfatasa específica invierte esta fosforilación reguladora cuando aumenta la relación [PQ]/[PQH_2].

fotones (excitones) para PSI, acelerando la oxidación de PQH_2 e invirtiendo el desequilibrio del flujo de electrones entre PSI y PSII. Con luz menos intensa (en la sombra, con más luz roja), PSI oxida PQH_2 a mayor velocidad de la que es producido por PSII, con lo que el aumento en [PQ] resultante provoca la desfosforilación de LHCII, invirtiendo el efecto de la fosforilación. La transición de estado en la localización de LHCII y la transición de la fotofosforilación cíclica a la no cíclica están reguladas de manera coordinada: la ruta de los electrones es principalmente no cíclica en el estado 1 y principalmente cíclica en el estado 2.

Cuando la luz es tan intensa que las actividades combinadas de PSII y PSI no pueden sintetizar ATP y NADPH lo suficientemente rápido para tratar todo el suministro de fotones, los carotenoides de LHCII absorben el excitón y muy rápidamente desactivan la clorofila excitada antes de que pueda crear especies de oxígeno reactivas (ROS) dañinas. Lo que provoca el cambio desde un estado de captura de luz eficiente a un estado disipador de energía es la disminución del pH en el espacio de la luz, pero aún no se conoce el mecanismo detallado de esta transición.

El agua es escindida por el complejo que desprende oxígeno

El agua es la fuente última de los electrones que pasan al NADPH en la fotosíntesis de plantas (oxigénicas). Una vez cedido un electrón a la feofitina, el $P680^+$ (de PSII) ha de adquirir un electrón para volver a su estado basal en preparación para la captura de otro fotón. En principio, el electrón requerido podría provenir de un gran número de compuestos orgánicos o inorgánicos. Las bacterias fotosintéticas utilizan diversos dadores electrónicos con este fin (acetato, succinato, malato o sulfuro) según su disponibilidad en un nicho ecológico determinado. Hace unos tres mil millones de años, la evolución de las bacterias fotosintéticas primitivas (progenitores de las cianobacterias actuales) produjeron un fotosistema capaz de tomar electrones de un dador que está siempre disponible: el agua. Se rompen dos moléculas de agua, que dan cuatro electrones, cuatro protones y oxígeno molecular:

$$2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$$

Un fotón aislado de luz visible no posee energía suficiente para romper los enlaces del agua; para esta reacción de rotura fotolítica se necesitan cuatro fotones.

Los cuatro electrones extraídos del agua no pasan directamente al $P680^+$, que sólo puede aceptar un electrón cada vez. En su lugar es un notable sistema molecular, el **complejo que desprende oxígeno** (también llamado **complejo de escisión del agua**), el que pasa cuatro electrones de *uno en uno* al $P680^+$ **(Fig. 20-24a)**. El dador electrónico inmediato al $P680^+$ es un residuo Tyr (a menudo representado mediante el símbolo Z o Tyr_Z) de la subunidad D1 del centro de reacción de PSII. El residuo Tyr pierde un protón y un electrón, generando un radical libre de Tyr eléctricamente neutro, $^•$Tyr:

$$4\ P680^+ + 4\ Tyr \longrightarrow 4\ P680 + 4\ {}^•Tyr \quad (20\text{-}2)$$

El radical Tyr recupera su electrón y protón perdidos por oxidación de un agrupamiento de cuatro iones manganeso y un ion calcio en el complejo de escisión del agua. Con cada transferencia electrónica sencilla, el agrupamiento de Mn_4CaO_5 queda más oxidado; cuatro transferencias electrónicas simples, correspondiente cada una a la absorción de un fotón, produce una carga de 4^+ sobre el complejo de Mn_4CaO_5 (Fig. 20-24):

$$4\ {}^•Tyr + [Mn_4CaO_5]^0 \longrightarrow 4\ Tyr + [Mn_4CaO_5]^{4+} \quad (20\text{-}3)$$

En este estado, el agrupamiento de Mn_4CaO_5 puede tomar cuatro electrones de un par de moléculas de agua, liberando $4H^+$ y O_2:

$$[Mn_4CaO_5]^{4+} + 2H_2O \longrightarrow [Mn_4CaO_5]^0 + 4H^+ + O_2 \quad (20\text{-}4)$$

Debido a que los cuatro protones producidos en esta reacción se liberan en la luz del tilacoide, el complejo liberador de oxígeno actúa como una bomba de protones, impulsada por transferencia de electrones. La suma de las Ecuaciones 20-1 a 20-4 es

$$2H_2O + 2PQ_B + 4\ fotones \longrightarrow O_2 + 2\ PQ_BH_2 \quad (20\text{-}5)$$

Se ha obtenido la estructura detallada del agrupamiento de desprendimiento de oxígeno mediante cristalografía de rayos X de alta resolución. El agrupamiento metálico tiene la forma de una silla (Fig. 20-24b). El asiento y las patas de la silla están formados por tres iones Mn, un ión Ca y cuatro átomos de O: el cuarto Mn y otro O forman el respaldo de la silla. En la estructura cristalina también se ven cuatro moléculas de agua, dos asociadas con uno de los iones Mn y las otras dos con el ion Ca. Es posible que una (o más) de estas moléculas de agua sea la que experimenta oxidación para producir O_2. Este agrupamiento metálico está asociado con varias proteí-

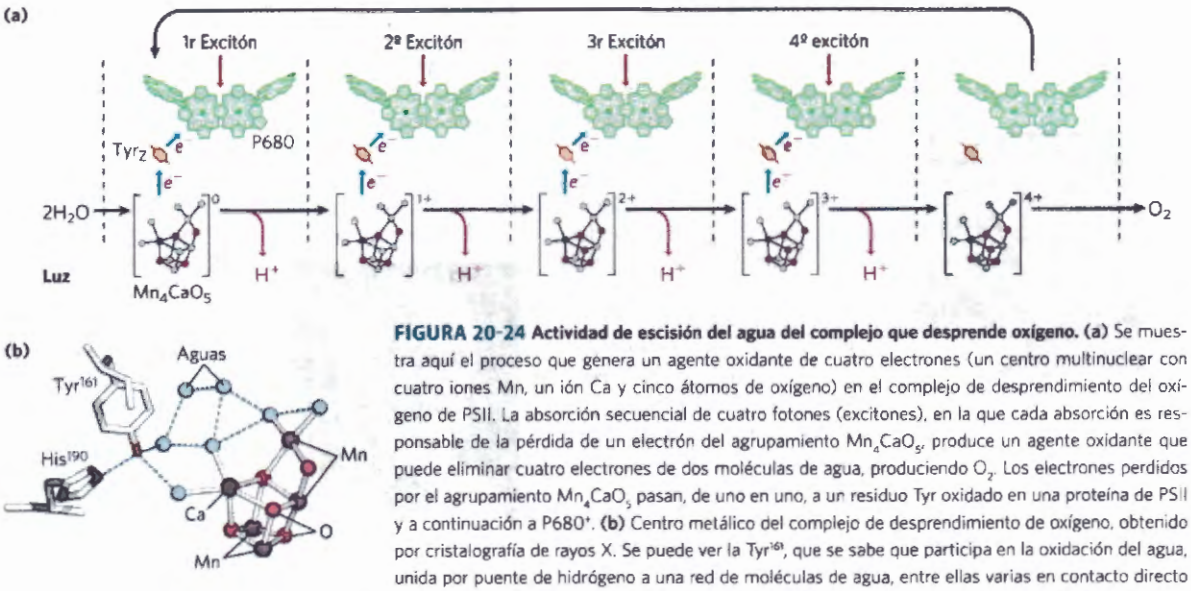


FIGURA 20-24 Actividad de escisión del agua del complejo que desprende oxígeno. (a) Se muestra aquí el proceso que genera un agente oxidante de cuatro electrones (un centro multinuclear con cuatro iones Mn, un ión Ca y cinco átomos de oxígeno) en el complejo de desprendimiento del oxígeno de PSII. La absorción secuencial de cuatro fotones (excitones), en la que cada absorción es responsable de la pérdida de un electrón del agrupamiento Mn_4CaO_5, produce un agente oxidante que puede eliminar cuatro electrones de dos moléculas de agua, produciendo O_2. Los electrones perdidos por el agrupamiento Mn_4CaO_5 pasan, de uno en uno, a un residuo Tyr oxidado en una proteína de PSII y a continuación a P680$^+$. **(b)** Centro metálico del complejo de desprendimiento de oxígeno, obtenido por cristalografía de rayos X. Se puede ver la Tyr^{161}, que se sabe que participa en la oxidación del agua, unida por puente de hidrógeno a una red de moléculas de agua, entre ellas varias en contacto directo con el agrupamiento Mn_4CaO_5. Este es el sitio de una de las reacciones más importantes de la biosfera. [Fuente: **(b)** PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011].

nas periféricas de membrana del lado de la luz de la membrana del tilacoide que se cree estabilizan el agrupamiento. El residuo Tyr designado Z, a través del que pasan electrones entre el agua y el centro de reacción de PSII, está conectado a una red de moléculas de agua unidas por puente de hidrógeno que incluyen las cuatro asociadas con el agrupamiento Mn_4CaO_5. No se conoce el mecanismo detallado de oxidación del agua por el agrupamiento Mn_4CaO_5, si bien está siendo objeto de investigación intensa. Loa reacción es básica para la vida en la tierra y puede que presente novedades sobre la química bioinorgánica. La determinación de la estructura del centro polimetálico ha inspirado varias hipótesis razonables sujetas a comprobación experimental. Manténgase atento.

RESUMEN 20.2 Centros de reacción fotoquímicos

- Las bacterias tienen un único centro de reacción fotoquímico; en las bacterias púrpura es del tipo feofitina-quinona, y en bacterias verdes del azufre del tipo Fe-S.
- Los estudios estructurales del centro de reacción de una bacteria púrpura han proporcionado información sobre el flujo electrónico impulsado por la luz desde un par especial de moléculas de clorofila (P870), a través de la feofitina, a las quinonas. A continuación, los electrones pasan desde las quinonas a través del complejo del citocromo bc_1 y vuelven al par especial de clorofilas.
- Una vía alternativa, en las bacterias verdes del azufre, envía los electrones desde las quinonas reducidas al NAD$^+$.
- Las cianobacterias y las plantas tienen dos centros de fotorreacción diferentes, PSI y PSII, que funcionan en tándem.
- En el centro de reacción del fotosistema II de plantas, un par especial de clorofilas (P680) pasa electrones a la plastoquinona y los electrones perdidos del P680 son reemplazados por electrones del H_2O (en otros organismos se utilizan dadores de electrones diferentes del H_2O).
- El fotosistema I de plantas pasa electrones desde el par especial excitado (P700) a su centro de reacción través de una serie de transportadores a la ferredoxina, que reduce el NADP$^+$ a NADPH.
- El flujo de electrones a través del complejo del citocromo b_6f impulsa los protones a través de la membrana plasmática, creando una fuerza protón-motriz que proporciona la energía para la síntesis de ATP por una ATP sintasa. La actividad de escisión del agua también desplaza electrones desde el estroma a la luz del tilacoide, contribuyendo al gradiente protónico.
- El flujo lineal de electrones a través de los fotosistemas produce NADPH y ATP. El flujo de electrones cíclico sólo produce ATP y permite que exista una variabilidad en las proporciones de NADPH y ATP formados.
- La localización de PSI y PSII entre los tilacoides granales y del estroma puede cambiar y está controlada indirectamente por la intensidad de la luz; con lo que se optimiza la distribución de excitones entre PSI y PSII para la captura eficiente de energía.
- La rotura del H_2O impulsada por la luz está catalizada por un complejo proteico que contiene Mn_4CaO_5; se produce O_2. La plastoquinona reducida transporta electrones al complejo del citocromo b_6f; de ahí los electrones pasan a la plastocianina y a continuación al P700 donde reemplazan a los que se perdieron durante su fotoexcitación.

20.3 Síntesis de ATP por fotofosforilación

Las actividades combinadas de los dos fotosistemas de plantas transportan electrones desde el agua al NADP$^+$, conservando parte de la energía de la luz absorbida en forma de NADPH (Fig. 20-16). Simultáneamente, se bombean protones a través de las membranas de los tilacoides y la energía se conserva en forma de potencial electroquímico. Seguidamente veremos el proceso por el cual este gradiente de protones impulsa la síntesis de

ATP, el otro producto conservador de la energía de las reacciones dependientes de luz.

En 1954 Daniel Arnon y colaboradores descubrieron que el ATP se genera a partir del ADP y del P_i durante la transferencia electrónica fotosintética en cloroplastos de espinaca iluminados. Estos hallazgos recibieron el apoyo del trabajo de Albert Frenkel que detectó la producción de ATP dependiente de la luz en estructuras membranosas que contenían pigmentos denominadas **cromatóforos**, procedentes de bacterias fotosintéticas. Los investigadores concluyeron que parte de la energía luminosa capturada por los sistemas fotosintéticos de estos organismos se transforma en energía del enlace fosfato del ATP en el proceso de la fotofosforilación.



Daniel Arnon, 1910–1994
[Fuente: Reinhard Bachofen.]

Un gradiente de protones acopla el flujo electrónico con la fosforilación

Varias propiedades de la transferencia electrónica fotosintética y de la fotofosforilación en cloroplastos indican que un gradiente de protones juega el mismo papel que el que juega en la fosforilación oxidativa mitocondrial: (1) los centros de reacción, transportadores electrónicos y enzimas formadores de ATP están localizados en una membrana impermeable a los protones, la membrana del tilacoide, que ha de estar intacta para llevar a cabo la fotofosforilación. (2) Se puede desacoplar la fotofosforilación del flujo electrónico mediante reactivos que promueven el paso de protones a través de la membrana del tilacoide. (3) Se puede bloquear la fotofosforilación por la venturicidina y otros agentes similares que inhiben la formación de ATP a partir de ADP y P_i por la ATP sintasa de las mitocondrias. (4) La síntesis de ATP es catalizada por complejos CF_oCF_1 localizados en la superficie exterior de la membrana del tilacoide, que son de estructura y función muy parecidas a las de los complejos F_oF_1 de las mitocondrias.

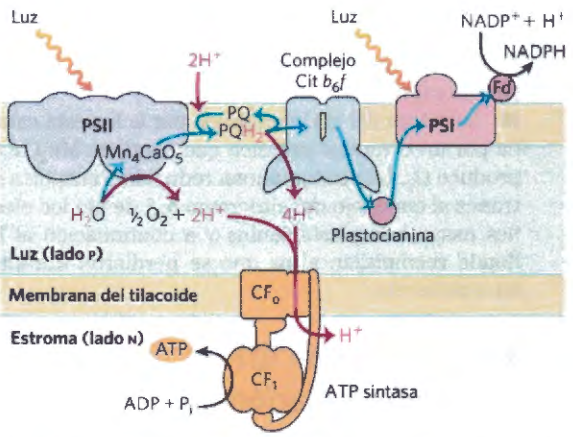
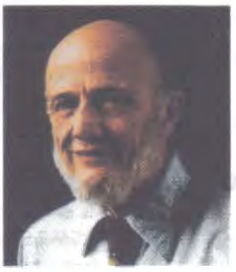


FIGURA 20-25 Circuitos de protones y electrones durante la fotofosforilación. Los electrones (flechas azules) se desplazan desde el H_2O a través de PSII, la cadena de transportadores intermedios, PSI y finalmente al $NADP^+$. Los protones (flechas rojas) se bombean a la luz del tilacoide por el flujo de electrones a través de la cadena de transportadores que unen PSII y PSI, y vuelven a entrar en el estroma a través de canales protónicos formados por CF_o de la ATP sintasa. La subunidad CF_1 cataliza la síntesis de ATP.

Las moléculas transferidoras de electrones en la cadena de transportadores que interconecta PSII con PSI están orientadas de forma asimétrica en la membrana del tilacoide, por lo que el flujo de electrones fotoinducido da lugar a un movimiento neto de protones a través de la membrana, desde el lado del estroma a la luz del tilacoide **(Fig. 20-25)**. En 1966 André Jagendorf demostró que un gradiente de pH a través de la membrana del tilacoide (exterior alcalino) podía proporcionar la fuerza motriz para generar ATP. Sus observaciones iniciales proporcionaron algunas de las pruebas experimentales más importantes en favor de la hipótesis quimiosmótica de Mitchell.



André Jagendorf
[Fuente: Cortesía de Professor André Jagendorf.]

Jagendorf incubó cloroplastos, en la oscuridad, en un tampón de pH 4, el cual penetró lentamente en el compartimiento interno de los tilacoides disminuyendo su pH interno. Añadió ADP y P_i a la suspensión oscura de cloroplastos y a continuación elevó de forma repentina el pH del medio externo hasta 8, creándose momentáneamente un gran gradiente de pH a través de la membrana. A medida que los protones salían desde los tilacoides hacia el medio, se generaba ATP a partir de ADP y P_i. Debido a que la formación tenía lugar en la oscuridad (sin aporte de energía luminosa), este experimento demostró que un gradiente de pH a través de una membrana constituye un estado de energía elevada que puede, al igual que en la fosforilación oxidativa mitocondrial, facilitar la transducción de la energía de la transferencia de electrones en energía química del ATP.

Se ha establecido la estequiometría aproximada de la fotofosforilación

A medida que se desplazan los electrones desde el agua al $NADP^+$ en los cloroplastos de plantas, se desplazan unos 12 protones desde el estroma a la luz del tilacoide por cada cuatro electrones pasados (es decir, por cada O_2 formado). Cuatro de esos protones se desplazan por el complejo que desprende oxígeno, y hasta ocho por el complejo del citocromo b_6f. El resultado cuantitativo es una diferencia de 1.000 veces en la concentración de H^+ a través de la membrana del tilacoide ($\Delta pH = 3$). Recuerde que la energía que se almacena en un gradiente de protones (el potencial electroquímico) tiene dos componentes: una diferencia en concentración de protones (ΔpH) y un potencial eléctrico (Δy) originado en la separación de cargas. En los cloroplastos, el componente dominante es ΔpH; aparentemente el movimiento de contraiones disipa la mayor parte del potencial eléctrico. En cloroplastos iluminados, la energía almacenada en el gradiente de protones por mol de protones es

$$\Delta G = 2.3RT\,\Delta pH + ZF\,\Delta\psi = -17\ \text{kJ/mol}$$

de tal modo que el movimiento de 12 moles de protones a través de la membrana del tilacoide representa la conservación de unos 200 kJ de energía, suficiente para impulsar las síntesis de varios moles de ATP ($\Delta G'^{\circ}$ = 30,5 kJ/mol). Las medidas experimentales dieron valores de unos 3 ATP por O_2 producido.

Para dirigir cuatro electrones desde el H_2O al NADPH se han de absorber al menos ocho fotones (un fotón por electrón en cada centro de reacción). La energía de ocho fotones de luz visible es más que suficiente para generar la síntesis de tres moléculas de ATP.

La síntesis de ATP no es la única reacción de conservación de la energía de la fotosíntesis en las plantas; el NADPH formado en la transferencia electrónica final también es rico energéticamente. La ecuación global para la fotofosforilación no cíclica (un término que se explica más adelante) es

$$2H_2O + 8 \text{ fotones} + 2NADP^+ + {\sim}3ADP^+ + {\sim}3P_i \longrightarrow O_2 + {\sim}3ATP + 2NADPH \quad (20\text{-}6)$$

La ATP sintasa de los cloroplastos se parece a la de la mitocondria

El enzima responsable de la síntesis de ATP en los cloroplastos es un gran complejo con dos componentes funcionales, CF_o y CF_1 (la *C* denota la localización, los cloroplastos). CF_o es un poro protónico transmembrana compuesto por varias proteínas integrales de membrana y es homólogo del F_o mitocondrial. CF_1 es un complejo de proteína periférica de membrana muy similar en composición de subunidades, estructura y función a la F_1 mitocondrial.

La microscopia electrónica de cloroplastos seccionados muestra complejos de ATP sintasa en forma de proyecciones en forma de pomo en la superficie *exterior* (del estroma o N) de las membranas de los tilacoides que se corresponden con los complejos de ATP sintasa que se proyectan sobre la superficie *interior* (matriz o N) de la membrana mitocondrial interna. Así, la relación entre la orientación de la ATP sintasa y la dirección del bombeo de protones es la misma en los cloroplastos y en las mitocondrias. En ambos casos la porción F_1 de la ATP sintasa está localizada en el lado más alcalino (N) de la membrana a través de la que fluyen los protones a favor de su gradiente de concentración; la dirección del flujo de protones en relación a F_1 es la misma en ambos casos: de P a N **(Fig. 20-26)**.

Se cree que el mecanismo de la ATP sintasa de cloroplastos es también esencialmente idéntico al de su análogo mitocondrial; ADP y P_i se condensan fácilmente para formar ATP sobre la superficie del enzima, y la liberación de este ATP ligado al enzima requiere una fuerza protón-motriz. La catálisis rotacional ocupa secuencialmente cada una de las tres subunidades β de la ATP sintasa en la síntesis de ATP, liberación de ATP, y unión de ADP + P_i (Figs. 19-26 y 19-27).

Se postula que la ATP sintasa de cloroplastos de espinaca, que tiene 14 subunidades c en su complejo CF_o, ha de tener una menor proporción de ATP formado respecto a electrones transferidos, en comparación con los complejos F_o bovino, de levadura o de *E. coli*, que tienen, 8, 10 y 10 subunidades c, respectivamente.

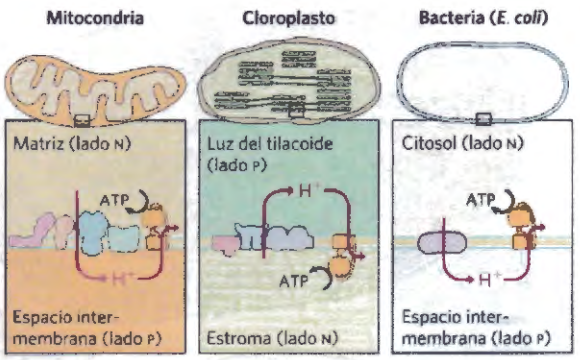


FIGURA 20-26 La orientación de la ATP sintasa está fijada en relación al gradiente de protones. Superficialmente puede parecer que la dirección del bombeo de protones en los cloroplastos sea la opuesta a la de las mitocondrias y bacterias. En las mitocondrias y bacterias, los protones se bombean *fuera* del orgánulo o célula al tiempo que F_1 se encuentra en el lado *interno* de la membrana; en los cloroplastos, los protones se bombean hacia *adentro* de la luz del tilacoides y CF_1 se encuentra en el *exterior* de la membrana tilacoide. No obstante, en los tres casos tiene lugar el mismo mecanismo de conversión de energía (del gradiente de protones al ATP). El ATP se sintetiza en la matriz de la mitocondria, en el estroma de los cloroplastos y en el citosol de las bacterias.

RESUMEN 20.3 Síntesis de ATP y fotofosforilación

- En las plantas, tanto la reacción de rotura del agua como el flujo electrónico a través del complejo del citocromo b_6f va acompañado del bombeo de protones a través de la membrana del tilacoide. La fuerza protón-motriz así creada impulsa la síntesis de ATP por un complejo CF_oCF_1 similar al complejo F_oF_1 de la mitocondria.
- El mecanismo de CF_oCF_1 es muy similar al de las ATP sintasas de mitocondrias y bacterias. La rotación física impulsada por el gradiente de protones se acompaña de la síntesis de ATP en sitios que se ciclan a través de tres conformaciones, una con alta afinidad por el ATP, una con alta afinidad por el ADP + P_i y una tercera con baja afinidad por ambos nucleótidos.

20.4 Evolución de la fotosíntesis oxigénica

La aparición de la fotosíntesis oxigénica sobre la tierra hace unos 2.500 millones de años fue un acontecimiento crucial en la evolución de la biosfera. Antes de ello, la atmósfera de la tierra contenía metano, CO_2 y N_2. El planeta carecía prácticamente de oxígeno molecular y estaba desprovista de una capa de ozono para proteger a los organismos vivos de la radiación UV solar. La fotosíntesis oxigénica puso a disposición un suministro casi ilimitado de un agente reductor (H_2O) para impulsar la producción de compuestos orgánicos mediante reacciones biosintéticas reductoras. También aparecieron mecanismos que permitieron a los organismos utilizar O_2 como aceptor electrónico terminal en transferencias de electrones muy energéticas a partir de sustratos orgánicos, empleando la energía de oxidación para sostener el metabolismo. El complejo aparato fotosintético de una planta vascular moderna es la culminación de una serie de acontecimientos evolutivos el más reciente

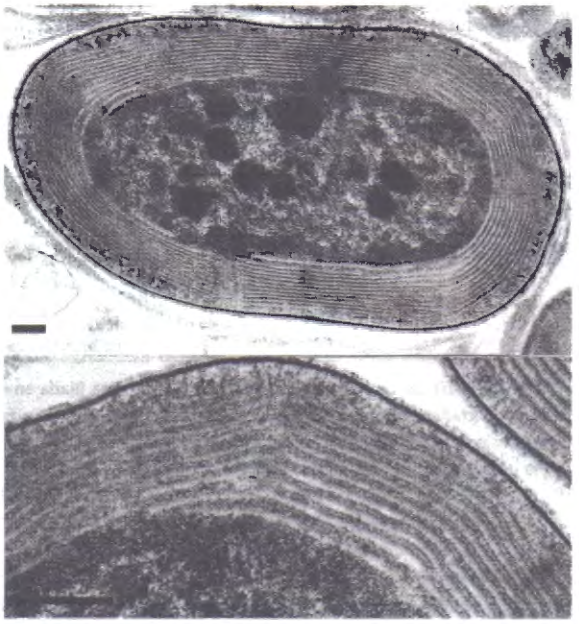


FIGURA 20-27 Membranas fotosintéticas de una cianobacteria. En estas secciones finas de una cianobacteria, observada con un microscopio electrónico de transmisión, se ve que las múltiples capas de las membranas internas ocupan la mitad del volumen de la célula. El extenso sistema de mebranas tiene la misma función que las membranas tilacoides de las plantas vasculares al proporcionar una gran área superficial que contiene toda la maquinaria fotosintética. (Barra = 100 nm). [Fuente: S. R. Miller et al., Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobaterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:850, 2005, Fig. 2 © National Academy of Sciences.]

de los cuales fue la adquisición por parte de las células eucarióticas de una cianobacteria endosimbionte.

Los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias fotosintéticas

Los cloroplastos de los organismos modernos se parecen a las mitocondrias en varias propiedades y, probablemente, se originaron por el mismo mecanismo que dio lugar a las mitocondrias: la endosimbiosis. Al igual que las mitocondrias los cloroplastos contienen su propio DNA y su maquinaria sintetizadora de proteínas. Algunos polipéptidos de las proteínas de los cloroplastos están codificados por genes de los cloroplastos y se sintetizan en los mismos; otros están codificados en genes nucleares, se sintetizan fuera de los cloroplastos y son importadas a los mismos (Capítulo 27). Cuando las células vegetales crecen y se dividen, los cloroplastos dan lugar a nuevos cloroplastos por división durante la que se replica su DNA dividiéndose entre los cloroplastos resultantes. En las cianobacterias modernas la maquinaria y mecanismos para la captura de la luz, el flujo electrónico y la síntesis de ATP son parecidos en muchos aspectos a los de los cloroplastos de las plantas. Estas observaciones condujeron a la hipótesis ampliamente aceptada en la actualidad de que los progenitores evolutivos de las células vegetales modernas eran eucariotas primitivos que engulleron cianobacterias fotosintéticas y establecieron una relación endosimbiótica estable entre ellos (véase la Fig. 1-40).

Al menos la mitad de la actividad fotosintética de la tierra se da actualmente en microorganismos: algas, otros eucariotas fotosintéticos y bacterias fotosintéticas. Las cianobacterias tienen PSII y PSI en tándem, y PSII tiene una actividad asociada de escisión de agua similar a la de plantas. Sin embargo, los grupos restantes de bacterias fotosintéticas tienen un único centro de reacción y no parten el H_2O ni producen O_2. Muchas son anaerobios obligados que no pueden tolerar el O_2; han de utilizar un compuesto diferente del H_2O como dador de electrones. Algunas bacterias fotosintéticas utilizan compuestos inorgánicos como dadores de electrones (e hidrógeno). Por ejemplo, las bacterias verdes del azufre utilizan sulfuro de hidrógeno:

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

Estas bacterias, en lugar de desprender O_2 molecular, producen azufre elemental como producto de oxidación del H_2S. (Después continúan oxidando el S a SO_4^{2-}). Otras bacterias fotosintéticas utilizan compuestos orgánicos como dadores de electrones, por ejemplo, lactato:

$$2 \text{ Lactato} + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2 \text{ piruvato}$$

La fotosíntesis en las plantas y en las bacterias son procesos fundamentalmente similares a pesar de las diferencias en los dadores de hidrógeno que utilizan. Esta similitud se hace más evidente cuando se escribe la ecuación de la fotosíntesis en una forma más general:

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2D$$

en la que H_2D representa un dador de electrones (e hidrógeno) y D es su forma oxidada. H_2D puede ser agua, sulfuro de hidrógeno, lactato o algún otro compuesto orgánico según la especie. Es muy probable que las bacterias que desarrollaron en primer lugar la capacidad fotosintética utilizasen H_2S como fuente de electrones.

Los parientes antiguos de las cianobacterias modernas aparecieron probablemente a causa de la combinación de material genético de dos tipos de bacterias fotosintéticas, con sistemas del tipo visto en las bacterias púrpura modernas (con una ruta electrónica del tipo PSII) y en las bacterias verdes del azufre (con una ruta para los electrones parecida a PSI). La bacteria con dos fotosistemas independientes pudo haber utilizado uno en un conjunto de condiciones y el otro en condiciones diferentes. Con el tiempo apareció un mecanismo que conectó los dos fotosistemas para su uso simultáneo al tiempo que el sistema tipo PSII adquirió la capacidad de escisión del agua que se encuentra en las cianobacterias modernas.

Las cianobacterias modernas pueden sintetizar ATP por fosforilación oxidativa o por fotofosforilación, aunque no tienen ni mitocondrias ni cloroplastos. La maquinaria enzimática para ambos procesos se encuentra en una membrana plasmática con muchos repliegues **(Fig. 20-27)**. En ambos procesos funcionan tres com-

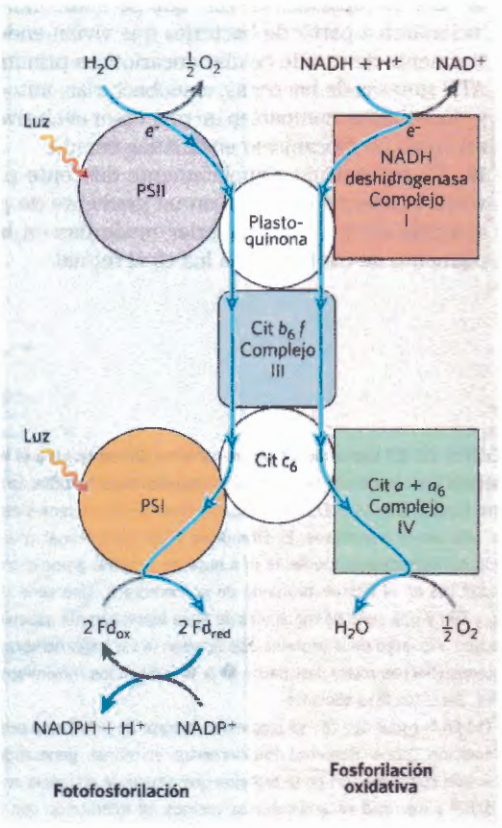


FIGURA 20-28 Los papeles duales del citocromo b_6f y del citocromo c_6 en cianobacterias reflejan orígenes evolutivos. Las cianobacterias utilizan el citocromo b_6f, el citocromo c_6 y la plastoquinona tanto en la fosforilación oxidativa como en la fotofosforilación. **(a)** En la fotofosforilación, los electrones fluyen (flechas azules) desde el agua hacia el $NADP^+$. **(b)** En la fosforilación oxidativa, los electrones fluyen desde el NADH hacia el O_2. Ambos procesos están acompañados por movimiento de protones a través de la membrana, efectuado por un ciclo Q

ponentes proteicos lo que es prueba de que los procesos tienen un origen evolutivo común **(Fig. 20-28)**. Primero, el complejo de bombeo de protones del citocromo b_6f transporta electrones desde la plastoquinona al citocromo c_6 en la fotosíntesis y también transporta electrones desde la ubiquinona al citocromo c_6 en la fosforilación oxidativa, papel desempeñado por el citocromo bc_1 en la mitocondria. Segundo, el citocromo c_6, homólogo del citocromo c mitocondrial, transporta electrones desde el Complejo III al Complejo IV en las cianobacterias; también puede transportar electrones desde el complejo del citocromo b_6f a PSI, una función realizada en las plantas por la plastocianina. Vemos, por tanto, la homología funcional entre el complejo del citocromo b_6f cianobacteriano y el complejo del citocromo bc_1 mitocondrial y entre el citocromo c_6 cianobacteriano y la plastocianina de plantas. El tercer componente conservado es la ATP sintasa, que funciona en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación en las cianobacterias y en las mitocondrias y cloroplastos de los eucariotas fotosintéticos. La estructura y el notable mecanismo de este enzima se han conservado cuidadosamente a lo largo de la evolución.

En *Halobacterium* una única proteína absorbe luz y bombea protones para impulsar la síntesis de ATP

En algunas arquebacterias modernas, ha aparecido un mecanismo totalmente diferente para convertir la energía de la luz en un gradiente electroquímico. La arquebacteria halófila (que le "gusta la sal") *Halobacterium salinarum*, comúnmente denominada halobacteria, sólo vive en estanques y lagos salados (Great Salt Lake y el Mar Muerto, por ejemplo) en donde las elevadas concentraciones de sal, que pueden ser superiores a 4 M, son resultado de la pérdida de agua por evaporación. En realidad las halobacterias no pueden vivir a concentraciones de NaCl inferiores a 3 M. Estos organismos son aeróbicos y normalmente utilizan O_2 para oxidar moléculas combustibles orgánicas. No obstante, la solubilidad del O_2 es tan baja en los estanques salados que algunas veces el metabolismo oxidativo se ha de complementar con luz solar como fuente alternativa de energía.

La membrana plasmática de *H. salinarum* contiene pequeñas extensiones del pigmento que absorbe luz **bacteriorrodopsina**, que contiene retinal (el aldehído derivado de la vitamina A; véase la Fig. 10-20) como grupo prostético colector de luz. Cuando se iluminan las células, el todo-*trans*-retinal unido a la bacteriorrodopsina absorbe un fotón y experimenta una fotoisomerización a 13-*cis*-retinal que fuerza un cambio de conformación de la proteína. El restablecimiento del todo-*trans*-retinal es simultáneo a la salida de protones al exterior a través de la membrana plasmática. La bacteriorrodopsina, con sólo 247 residuos aminoácidos, es la bomba de protones impulsada por la luz más sencilla que se conoce. La diferencia en estructura tridimensional entre la bacteriorrodopsina en la oscuridad y después de la iluminación **(Fig. 20-29a)** sugiere una vía por la cual una serie de "saltos" concertados de protones puede transportar efectivamente un protón a través de la membrana. El cromóforo retinal se une mediante una base de Schiff al grupo ε-amino de un residuo Lys. En la oscuridad el nitrógeno de esta base de Schiff se encuentra protonado; en la luz, la fotoisomerización del retinal disminuye el pK_a de este grupo y cede su protón a un residuo Asp cercano, desencadenando una serie de saltos de protones que finalmente provocan la liberación de un protón en la superficie exterior de la membrana (Fig. 20-29b).

El potencial electroquímico a través de la membrana impulsa los protones de nuevo al interior de la célula a través de un complejo ATP sintasa de la membrana muy parecido al de mitocondrias y cloroplastos. De este modo, las halobacterias pueden utilizar la luz para suplementar el ATP sintetizado en la fosforilación oxidativa cuando el O_2 es limitado. Las halobacterias no desprenden O_2, ni llevan a cabo la fotorreducción del $NADP^+$; su maquinaria de fototransducción es, por tanto, mucho más sencilla que la de las cianobacterias o la de las plantas. No obstante, el mecanismo de bombeo protónico puede constituir un prototipo de otras bombas de iones más complejas.

COPY-STATION

RESUMEN 20.4 Evolución de la fotosíntesis oxigénica

- Las cianobacterias modernas proceden de un organismo antiguo que adquirió dos fotosistemas, uno del tipo del que se encuentra actualmente en las bacterias púrpura y el otro del tipo que se encuentra en las bacterias verdes del azufre.
- Muchos microorganismos fotosintéticos obtienen electrones para la fotosíntesis no del agua sino de dadores tales como el H_2S.
- Las cianobacterias con los fotosistemas en tándem y una actividad de escisión del agua que libera oxígeno a la atmósfera aparecieron en la tierra hace unos 2.500 millones de años.
- Los cloroplastos, al igual que las mitocondrias, evolucionaron a partir de bacterias que vivían endosimbióticamente dentro de células eucarióticas primitivas. Las ATP sintasas de bacterias, cianobacterias, mitocondrias y cloroplastos, comparten un precursor evolutivo común así como un mecanismo enzimático común.
- Un mecanismo completamente diferente para convertir la energía luminosa en un gradiente de protones apareció en las arquebacterias modernas en la que el pigmento de captura de la luz es el retinal.

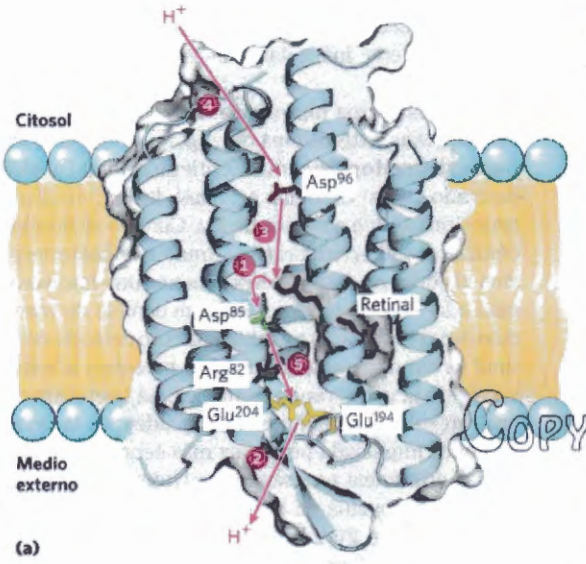
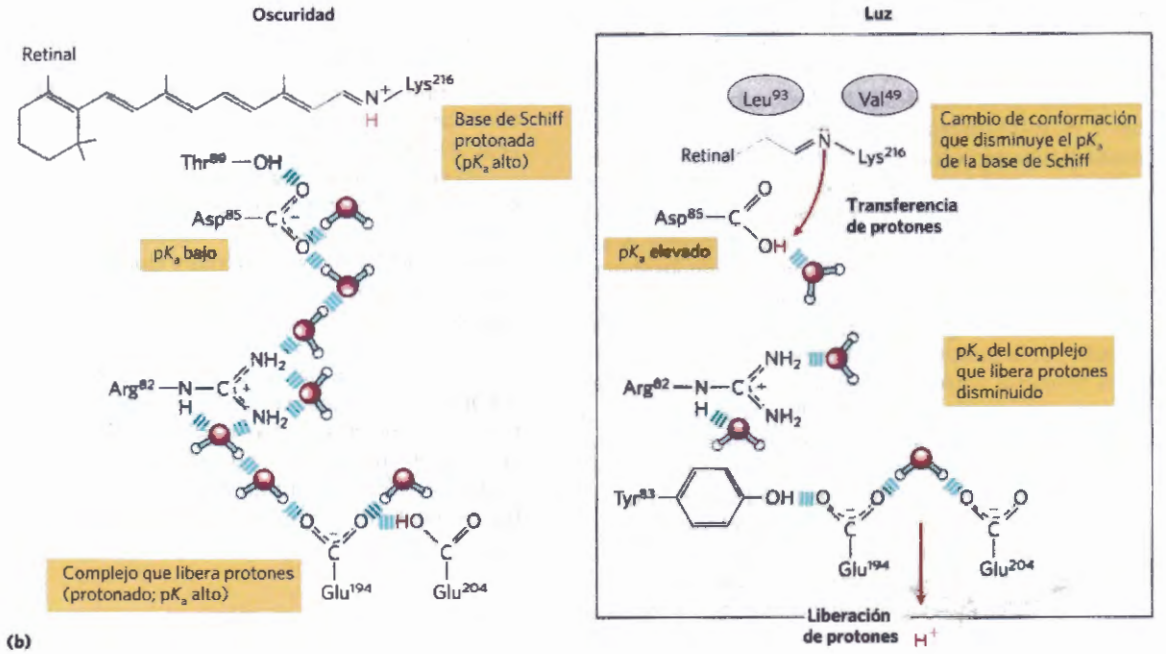


FIGURA 20-29 Evolución de un mecanismo diferente para el bombeo de protones impulsado por la luz en una arquebacteria halófila. (a) La bacteriorrodopsina (M_r 26.000) de *Halobacterium halobium* tiene siete hélices α que abarcan la membrana. El cromóforo todo-*trans*-retinal (púrpura) está unido covalentemente mediante una base de Schiff al grupo ε-amino de un residuo Lys en el interior profundo de la membrana. Una serie de residuos Asp y Glu y una serie de moléculas de agua estrechamnte asociadas se distribuyen a lo largo de la proteína que aportan la vía transmembrana para los protones (flechas rojas). Los pasos ❶ a ❺ indican los movimientos de protones, descritos más adelante.

(b) En la oscuridad (panel izquierdo), la base de Schiff está protonada. La iluminación (panel derecho) fotoisomeriza el retinal, generando cambios sutiles de conformación en la proteína que alteran la distancia entre la base de Schiff y los residuos aminoácidos vecinos. La interacción con estos vecinos (Leu[93] y Val[49]) disminuye el pK_a de la base de Schiff protonada, y la base cede su protón a un grupo carboxilo próximo del Asp[85] (paso ❶ en (a)). Esto inicia una serie de saltos de protones concertados entre moléculas de agua (véase la Fig. 2-14) en el interior de la proteína, que acaba ❹ con la liberación de un protón que estaba compartido por Glu[194] y Glu[204] cercanos a la superficie extracelular. ❺ La base de Schiff recupera un protón desde el Asp[96], ❷ que a su vez toma un protón del citosol. ❸ Finalmente, el Asp[85] cede su protón, dando lugar a la reprotonación del par Glu[204]-Glu[194]. El sistema vuelve a estar listo para otra ronda de bombeo de protones. [Fuentes: (a) PDB ID 1C8R, H. Luecke et al., *Science* 286:255, 1999). (b) Información de R. B. Gennis y T. G. Ebrey, *Science* 286:252; 1999.]



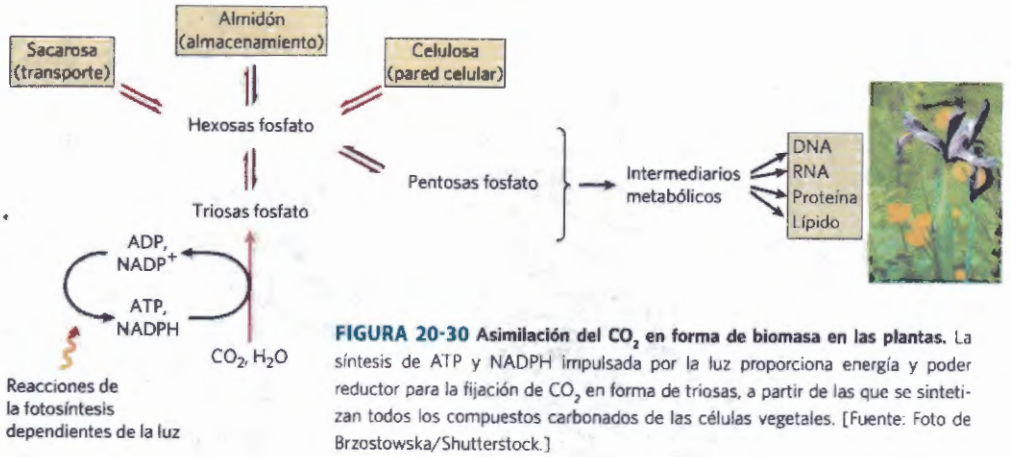


FIGURA 20-30 Asimilación del CO_2 en forma de biomasa en las plantas. La síntesis de ATP y NADPH impulsada por la luz proporciona energía y poder reductor para la fijación de CO_2 en forma de triosas, a partir de las que se sintetizan todos los compuestos carbonados de las células vegetales. [Fuente: Foto de Brzostowska/Shutterstock.]

20.5 Reacciones de asimilación del carbono

Los organismos fotosintéticos utilizan el ATP y el NADPH producidos en las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis para sintetizar los miles de componentes que constituyen el organismo. Esto es posible gracias a ciertas capacidades enzimáticas y rutas, que no están presentes en los quimioheterótrofos (por ejemplo los humanos), pero que han evolucionado en los fotoautótrofos (véase la Fig. 1-6). Las plantas (y otros autótrofos) pueden reducir el CO_2 atmosférico a triosas para la síntesis de celulosa y almidón, lípidos y proteínas y demás compuestos orgánicos de las plantas **(Fig. 20-30)**. Al carecer de estas capacidades sintéticas, los humanos y otros animales, dependen en último término de los organismos fotosintéticos para obtener los combustibles reducidos y precursores orgánicos esenciales para la vida.

Las plantas verdes contienen en sus cloroplastos una maquinaria enzimática que cataliza la conversión del CO_2 en compuestos orgánicos sencillos (reducidos), proceso que se denomina **asimilación de CO_2**. Este proceso se ha llamado también **fijación de CO_2** o **fijación de carbono**, aunque aquí reservaremos estos términos para la reacción específica en la que el CO_2 es incorporado (fijado) en un compuesto orgánico de tres carbonos, la triosa fosfato 3-fosfoglicerato. Este producto sencillo de la fotosíntesis es el precursor de biomoléculas más complejas, entre ellas glúcidos, polisacáridos y metabolitos derivados de los mismos, todos los cuales se sintetizan a través de rutas metabó-



Melvin Calvin, 1911–1997 [Fuente: Ted Spiegel/Corbis.]

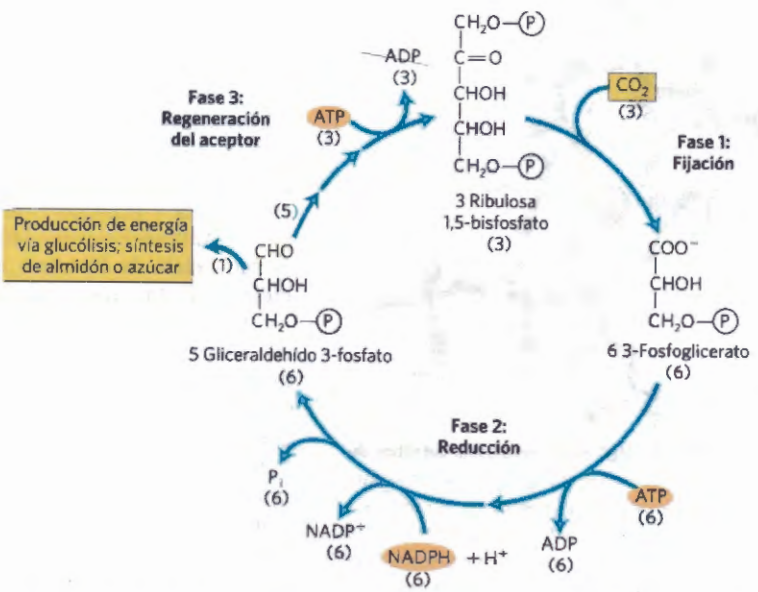
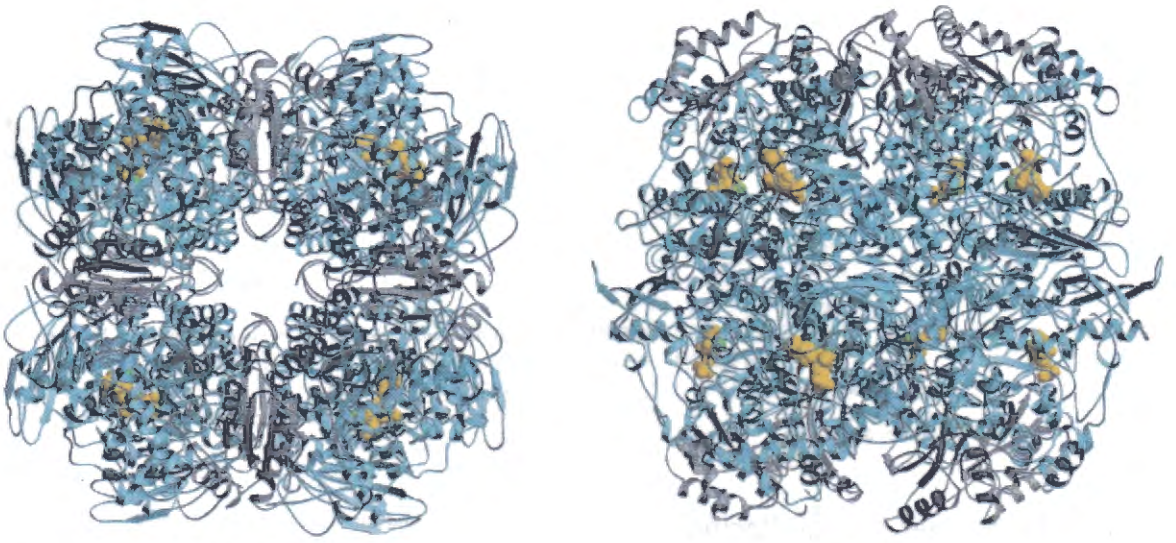


FIGURA 20-31 Las tres fases de la asimilación del CO_2 en los organismos fotosintéticos. Las estequiometrías de tres intermediarios clave (números en paréntesis) revelan el destino de los átomos de carbono que entran y abandonan el ciclo de Calvin o ciclo de la reducción fotosintética del carbono. Tal como se muestra aquí, se fijan tres CO_2 para la síntesis neta de una molécula de gliceraldehído 3-fosfato.



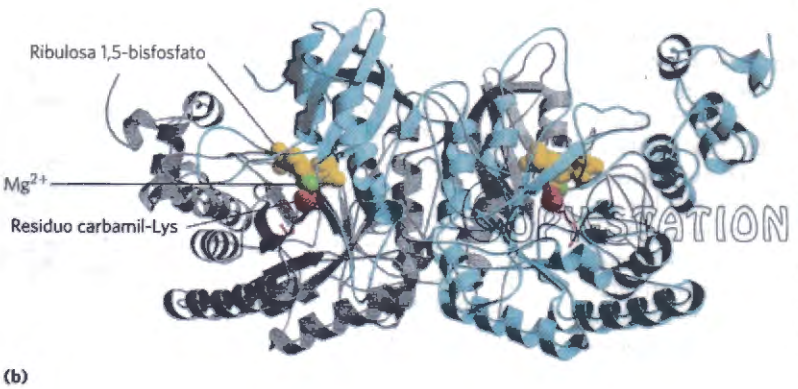


FIGURA 20-32 Estructura de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (rubisco). (a) Vista superior y vista lateral de un modelo de cintas de la rubisco de la forma I de espinaca. El enzima tiene ocho subunidades grandes (azul) y ocho subunidades pequeñas (gris), fuertemente empaquetadas en una estructura de M_r >500.000. La rubisco se encuentra presente a una concentración de unos 250 mg/mL en el estroma del cloroplasto lo que corresponde a una concentración extraordinariamente eleva da de sitios activos (~4 mM). Un análogo del estado de transición, 2-carboxiarabinitol bisfosfato (amarillo) unido a cada uno de los ocho sitios de unión de sustrato. El Mg^{2+} se muestra en verde. **(b)** Modelo de cintas de la rubisco de la forma II de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* (PDB ID 9RUB). Las subunidades idénticas se muestran en gris y azul. [Fuentes: **(a)** PDB ID 8RUC, I. Andersson et al., *J. Mol. Biol.* 259:160, 1996. **(b)** PDB ID 9RUB, T. Lundqvist y G. Schneider, *J. Biol. Chem.* 266:12604, 1991.]

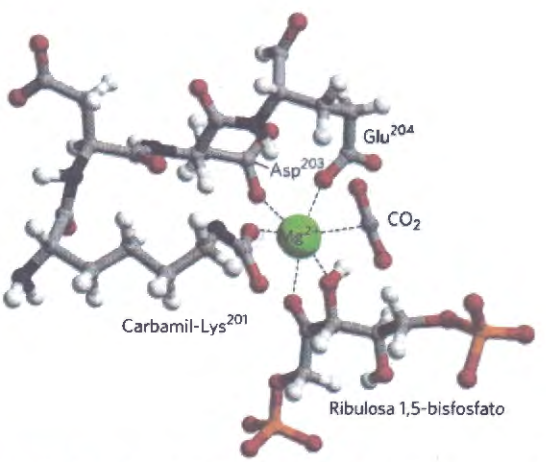


FIGURA 20-33 Papel central del Mg^{2+} en el mecanismo catalítico de la rubisco. El Mg^{2+} está coordinado en un complejo aproximadamente octaédrico con seis átomos de oxígeno: un oxígeno en el carbamato sobre la Lys^{201}; dos en los grupos carboxilo de Glu^{204} y Asp^{203}; dos en C-2 y C-3 del sustrato, ribulosa 1,5-bisfosfato y uno en el otro sustrato, CO_2. Una molécula de agua ocupa el sitio de unión del CO_2 en esta estructura cristalina. En esta figura se ha modelado una molécula de CO_2 en su sitio. (La numeración de los residuos se refiere al enzima de espinaca). [Fuente: Procedente de PDB ID 1RXO, T. C. Taylor and I. Andersson, *J. Mol. Biol.*265:432, 1997.]

licas similares a las de los tejidos animales. El dióxido de carbono se asimila en una ruta cíclica en la que se regeneran constantemente intermediarios clave. La ruta fue descubierta a principios de los años 1950 por Melvin Calvin, Andrew Benson y James A. Bassham y a menudo se llama **ciclo de Calvin** o, de manera más descriptiva, **ciclo de reducción fotosintética del carbono.**

El metabolismo de los glúcidos es más complejo en las células vegetales que en las animales o en los microorganismos no fotosintéticos. Además de las rutas universales de la glucólisis y la gluconeogénesis, las plantas tienen la secuencia de reacciones específica para la reducción del CO_2 a triosas fosfato y la ruta reductora asociada de las pentosas fosfato, todas las cuales han de estar reguladas de forma coordinada para asegurar la asignación adecuada de carbono a la producción de energía y a la síntesis de almidón y sacarosa. Tal como veremos, los enzimas clave están regulados por (1) reducción de enlaces disulfuro por electrones que fluyen desde el fotosistema I y (2) cambios en el pH y concentración de Mg^{2+} resultantes de la iluminación.

Cuando observamos otros aspectos del metabolismo de glúcidos en plantas también encontramos enzimas que son modulados por (3) regulación alostérica convencional por uno o más intermediarios metabólicos y (4) modificación covalente (fosforilación).

La asimilación del dióxido de carbono tiene lugar en tres fases

La primera fase de la asimilación del CO_2 en biomoléculas **(Fig. 20-31)** es la reacción de fijación del carbono: condensación del CO_2 con un aceptor de cinco carbonos, la **ribulosa 1,5-bisfosfato**, con formación de dos moléculas de **3-fosfoglicerato**. En la segunda fase el 3-fosfoglicerato se reduce a triosas fosfato. En conjunto, se fijan tres moléculas de CO_2 a tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato para formar seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (18 carbonos) en equilibrio con la dihidroxiacetona fosfato. En la tercera fase se utilizan cinco de las seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (15 carbonos) en la regeneración de tres moléculas del material inicial ribulosa 1,5-bisfosfato (15 carbonos). La sexta molécula de triosa fosfato, el producto neto de la fotosíntesis, puede ser utilizada para formar hexosas que sirven como combustible y como material para producir sacarosa para el transporte a tejidos no fotosintéticos o almidón para almacenamiento. De este modo el proceso es cíclico y permite la conversión continua de CO_2 en triosas y hexosas fosfato. La fructosa 6-fosfato es un intermediario clave en la fase 3 de la asimilación del CO_2; es un punto de bifurcación, que dirige hacia la regeneración de ribulosa 1,5-bisfosfato o hacia la síntesis de almidón. En la ruta desde hexosa fosfato a pentosa bisfosfato intervienen muchas de las reacciones utilizadas en células animales para la conversión de pentosas fosfato en hexosas fosfato durante la fase no oxidativa de la **ruta de las pentosas fosfato** (véase la Fig. 14-23). En la asimilación fotosintética del CO_2, esta ruta funciona en la dirección opuesta, utilizando básicamente el mismo conjunto de reacciones que convierten hexosas fosfato en pentosas fosfato. Este **ciclo reductor de pentosas fosfato** utiliza los mismos enzimas que la ruta oxidativa y varios enzimas adicionales que hacen que el ciclo reductor sea irreversible. Los 13 enzimas de la ruta se encuentran en el estroma del cloroplasto.

Fase 1: Fijación del CO_2 en 3-fosfoglicerato A finales de la década de 1940 se descubrió una pista importante sobre la naturaleza de los mecanismos de asimilación del CO_2 en los organismos fotosintéticos cuando Calvin y colaboradores iluminaron una suspensión de algas verdes en presencia de dióxido de carbono radiactivo ($^{14}CO_2$) durante unos pocos segundos. Rápidamente mataron las células, extrajeron su contenido y utilizaron métodos cromatográficos para buscar los metabolitos en los que aparecía primeramente el carbono marcado. El primer compuesto que se marcaba era el 3-fosfoglicerato, con el ^{14}C localizado de manera predominante en el átomo de carbono carboxílico. Estos experimentos sugerían fuertemente que el 3-fosfoglicerato es un intermediario temprano en la fotosíntesis. El gran número de plantas en las que este compuesto de tres carbonos es el primer intermediario se denominan **plantas C_3**, en contraposición con las plantas C_4 que se describen más adelante.

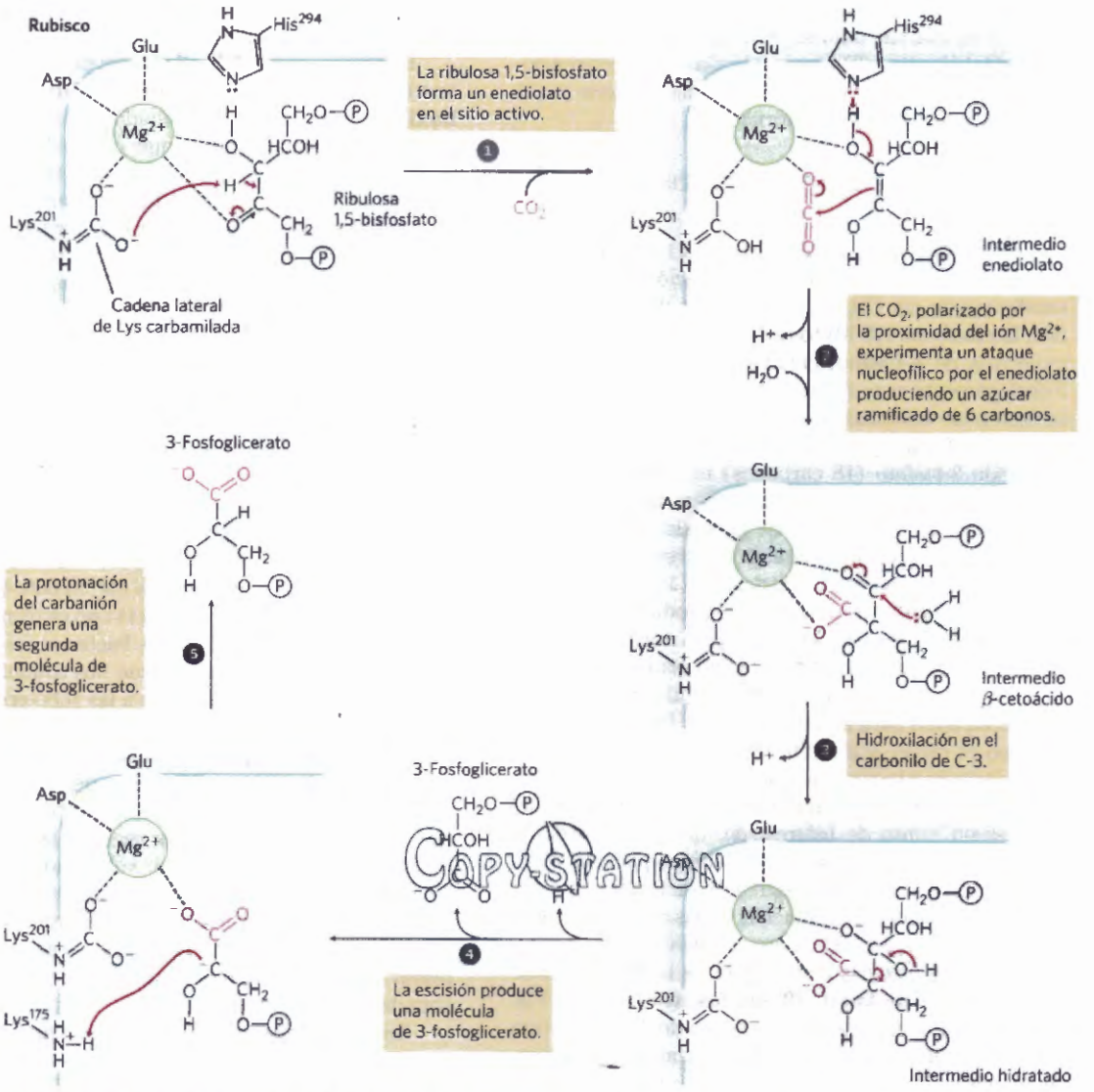
El enzima que cataliza la incorporación del CO_2 en una forma orgánica es la **ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa** (a menudo llamada abreviadamente **rubisco**). En tanto que carboxilasa la rubisco cataliza la unión covalente del CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5-bisfosfato y la rotura del intermedio inestable de seis carbonos con formación de dos moléculas de 3-fosfoglicerato, una de las cuales es portadora del nuevo carbono introducido en forma de CO_2 en su grupo carboxilo (Fig. 20-31). La actividad oxigenasa del enzima se discute en la Sección 20.2.

Existen dos clases diferentes de rubisco. La forma I se encuentra en las plantas vasculares, algas y cianobacterias; la forma II está confinada a ciertas bacterias fotosintéticas. La rubisco vegetal, enzima clave en la producción de biomasa a partir del CO_2, tiene una estructura compleja de forma I **(Fig. 20-32a)**, con ocho subunidades grandes idénticas (M_r 53.000; codificada en el plastoma) con un sitio catalítico en cada una de ellas y ocho subunidades pequeñas idénticas (M_r 14.000; codificadas en el genoma nuclear) cuya función no es bien conocida. La rubisco de la forma II de las bacterias fotosintéticas es de estructura más sencilla, con dos subunidades que se parecen en muchos aspectos a las subunidades grandes del enzima vegetal (Fig. 20-32b). Esta similitud es consistente con la hipótesis endosimbiótica sobre el origen de los cloroplastos. El enzima de plantas tiene un número de recambio excepcionalmente bajo; sólo se fijan tres moléculas de CO_2 por segundo por molécula de rubisco a 25 °C. Para conseguir velocidades elevadas de fijación de CO_2 las plantas necesitan, por tanto, grandes cantidades de este enzima. De hecho la rubisco constituye alrededor del 50% de la proteína soluble del cloroplasto y es probablemente uno de los enzimas más abundantes de la biosfera.

En el mecanismo propuesto para la rubisco de plantas tiene un papel central una cadena lateral de Lys carbamilada y con un ión Mg^{2+} unido. El ión Mg^{2+} pone en contacto y orienta los reactivos en el sitio activo **(Fig. 20-33)** al tiempo que polariza el CO_2 exponiéndolo al ataque nucleofílico por el intermedio de la reacción, un enediolato de cinco carbonos, formado sobre el enzima **(Fig. 20-34)**. El intermedio de seis carbonos resultante se rompe dando dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

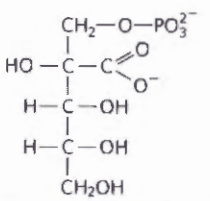
Como catalizador del primer paso de la asimilación fotosintética de CO_2, la rubisco es una diana principal para la regulación. El enzima es inactivo hasta que se carbamila en el grupo ε-amino de la Lys^{201} **(Fig. 20-35)**. La ribulosa 1,5-bisfosfato inhibe la carbamilación al unirse fuertemente al sitio activo con lo que bloquea el enzima en la conformación "cerrada" en la que la Lys^{201} es inaccesible. La **rubisco activasa** supera la inhibición al promover la liberación de la ribulosa 1,5-bisfosfato dependiente de ATP con lo que se expone el grupo amino de la Lys a la carbamilación no enzimática por el CO_2; ello va seguido de la fijación de Mg^{2+} que activa la rubisco. La rubisco activasa de algunas especies es activada por la luz mediante un mecanismo redox similar al mostrado en la Fig. 20-46.

Otro mecanismo regulador implica el "inhibidor nocturno" 2-carboxiarabinitol 1-fosfato, un análogo del



MECANISMO FIGURA 20-34 Primera fase de la asimilación de CO_2: actividad carboxilasa de la rubisco. La reacción de fijación de CO_2 está catalizada por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco). La reacción global consigue la combinación de un CO_2 y una ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato, uno de los cuales contiene el átomo de carbono del CO_2 (rojo). Transferencias de protones adicionales (no mostradas) tienen lugar en varios de estos pasos con la intervención de Lys^{201}, Lys^{175} e His^{294}.

estado de transición presente en la naturaleza con una estructura similar a la del intermedio β-cetoácido de la reacción de la rubisco (Fig. 20-34). Este compuesto, sintetizado en la oscuridad por algunas plantas, es un potente inhibidor de la rubisco carbamilada. Es degradado cuando vuelve la luz o es expelido por la rubisco activasa, lo que activa la rubisco.



2-Carboxiarabinitol 1-fosfato

Fase 2: Conversión del 3-fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato El 3-fosfoglicerato formado en la fase 1 se convierte en gliceraldehído 3-fosfato en dos pasos que son, básicamente, el inverso de los pasos correspondientes en la glucólisis, con una excepción: el cofactor nucleotídico para la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato es el NADPH y no el NADH **(Fig. 20-36)**. El estroma del cloroplasto contiene todos los enzimas glucolíticos excepto la fosfoglicerato mutasa. Los enzimas del estroma son isozimas de los que se encuentran en el citosol; ambos conjuntos de enzimas catalizan las mismas reacciones, pero son el producto de genes diferentes.

En el primer paso de la fase 2, la **3-fosfoglicerato quinasa** del estroma cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al 3-fosfoglicerato, dando 1,3-bisfosfoglicerato. A continuación el NADPH cede electrones en una reducción catalizada por el isozima

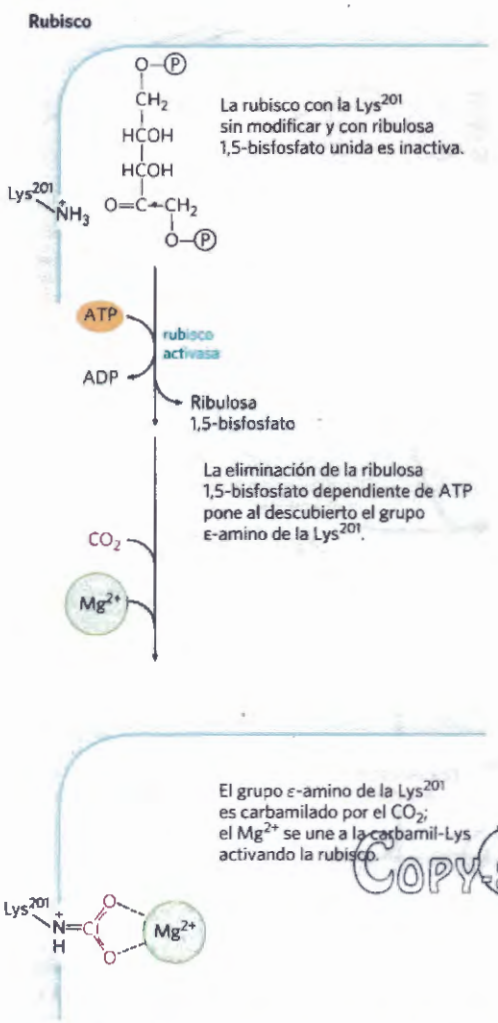


FIGURA 20-35 Papel de la rubisco activasa en la carbamilación de la Lys^{201} de la rubisco. Cuando el sustrato ribulosa 1,5-bisfosfato está unido al sitio activo, la Lys^{201} no es accesible. La rubisco activasa acopla la hidrólisis de ATP con la expulsión del azúcar bisfosfato unido, exponiendo la Lys^{201}; este residuo Lys puede ser ahora carbamilado con CO_2 en una reacción que aparentemente no está facilitada por un enzima. El Mg^{2+} es atraído por la carbamil-Lys cargada negativamente uniéndose a ella con lo que se activa el enzima.

específico del cloroplasto de la **gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa**, produciendo gliceraldehído 3-fosfato y P_i. La triosa fosfato isomerasa interconvierte a continuación el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. La mayor parte de las triosas fosfato así producidas se utilizan para regenerar la ribulosa 1,5-bisfosfato; el resto se convierte en almidón en el cloroplasto que es almacenado para su uso posterior, o se exporta inmediatamente al citosol y se convierte en sacarosa para su transporte hacia partes de la planta en crecimiento. En las hojas en desarrollo, una parte significativa de la triosa fosfato puede ser degradada por la glucólisis para obtener energía.

Fase 3: Regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de triosas fosfato La primera reacción en la asimilación de CO_2 para dar triosas fosfato consume ribulosa 1,5-bisfosfato. Para el flujo continuo de CO_2 hacia glúcidos, se debe regenerar constantemente la ribulosa 1,5-bisfosfato. Esto se consigue con una serie de reacciones **(Fig. 20-37)** que, junto con las fases 1 y 2, forman la ruta cíclica que se muestra en la Figura 20-31. El producto de la primera reacción de asimilación (3-fosfoglicerato) experimenta una serie de transformaciones que regeneran la ribulosa 1,5-bisfosfato. Entre los intermediarios de esta ruta se cuentan azúcares de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos. En la discusión siguiente todos los números de paso se refieren a la Figura 20-37.

Los pasos ❶ y ❹ están catalizados por el mismo enzima, la **aldolasa**, que cataliza primero la condensación reversible del gliceraldehído 3-fosfato con la dihidroxiacetona fosfato dando fructosa 1,6-bisfosfato (paso ❶); ésta se rompe dando fructosa 6-fosfato y P_i por la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) en el paso ❷. La reacción es muy exergónica y prácticamente irreversible. El paso ❸ es catalizado por la **transcetolasa**, que contiene tiamina pirofosfato (TPP) como grupo prostético (véase la Fig. 14-15a) y requiere Mg^{2+}. La transcetolasa cataliza la transferencia reversible de un grupo cetol de dos carbonos ($CH_2OH—CO—$) desde una cetosa fosfato dadora, la fructosa 6-fosfato, a una aldosa fosfato aceptora, el gliceraldehído 3-fosfato **(Fig. 20-38a, b)**. formando la pentosa xilulosa 5-fosfato y la tetrosa eritrosa 4-fosfato. En el paso ❹ la aldolasa actúa de nuevo combinando la eritrosa 4-fosfato con la dihidroxiacetona fosfato dando la **sedoheptulosa 1,7-bisfosfato** de siete carbonos. Un enzima específico de los plastidios, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa convierte el bisfosfato en sedoheptulosa 7-fosfato (paso ❺); ésta es la segunda reacción irreversible de la ruta. La transcetolasa vuelve a actuar (paso ❻) y convierte la sedoheptulosa 7-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato en dos pentosas fosfato (Fig. 20-38c). La **Figura 20-39** muestra cómo un fragmento de dos carbonos es transportado temporalmente en el cofactor de la transcetolasa, el TPP, y condensado con los tres carbonos del gliceraldehído 3-fosfato en el paso ❻.

Las pentosas fosfato formadas en las reacciones de la transcetolasa, ribosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato, se convierten en **ribulosa 5-fosfato** (pasos ❼ y ❽) que, en la reacción final del ciclo, ❾, se fosforila a ribulosa 1,5-bisfosfato por la ribulosa 5-fosfato quinasa **(Fig. 20-40)**. Ésta es la tercera reacción muy exergónica de la ruta ya que el enlace anhídrido fosfato del ATP se cambia por un éster fosfato en la ribulosa 1,5-bisfosfato.

COPY-STATION

Cada triosa fosfato sintetizada a partir de CO_2 cuesta seis NADPH y nueve ATP

El resultado neto de tres vueltas del ciclo de Calvin es la conversión de tres moléculas de CO_2 y una molécula de fosfato en una molécula de triosa fosfato. En la **Figura 20-41** se muestra la estequiometría global de la ruta desde el CO_2 a triosa fosfato con regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato. Se condensan tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato (un total de 15 carbonos) con tres moléculas de CO_2 (tres carbonos) formando seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Estas seis moléculas de 3-fosfoglicerato se reducen a seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (que están en equilibrio

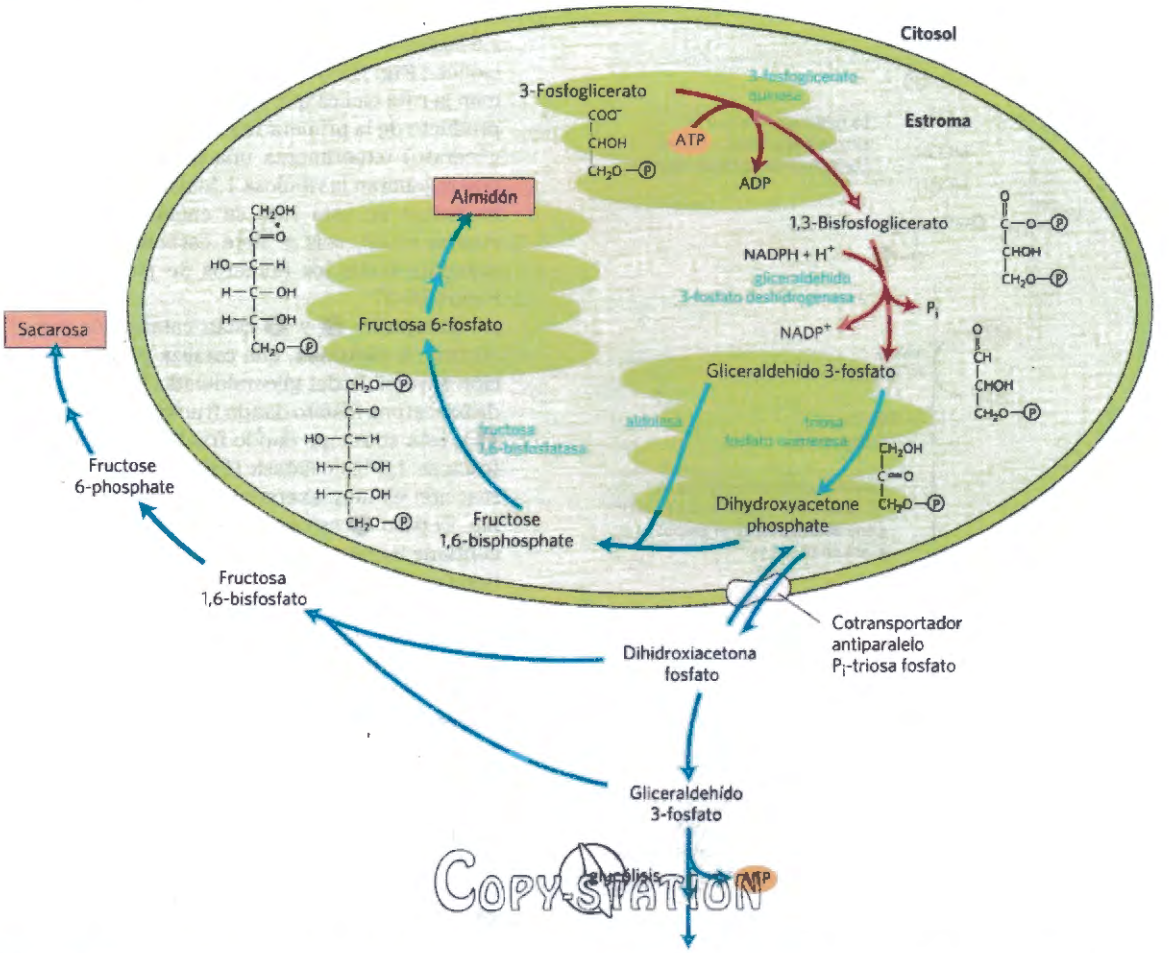


FIGURA 20-36 Segunda fase de la asimilación de CO_2. El 3-fosfoglicerato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato (flechas rojas). El carbono fijado del gliceraldehído 3-fosfato tiene varios destinos posibles (flechas azules). La mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato (10 de cada 12 moles) se recicla para formar 6 moles de pentosas fosfato tal como se muestra en la Fig. 20-37. Los 2 moles restantes de triosa fosfato, la ganancia neta en carbono fijado, se convierten en sacarosa para el transporte o se almacena en forma de almidón en el cloroplasto. En este último caso el gliceraldehído 3-fosfato se condensa con dihidroxiacetona fosfato en el estroma convirtiéndose en fructosa 1,6-bisfosfato que es un precursor del almidón. En otras situaciones, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en dihidroxiacetona fosfato que abandona el cloroplasto vía un transportador específico (véase la Fig. 20-42) y, en el citosol, se puede degradar glucolíticamente para producir energía o utilizarse para formar fructosa 6-fosfato y, por tanto, sacarosa.

con la dihidroxiacetona fosfato) con gasto de seis ATP (en la síntesis de 1,3-bisfosfoglicerato) y seis NADPH (en la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato). El isozima de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa presente en los cloroplastos puede utilizar NADP como transportador electrónico y funciona normalmente en la dirección de la reducción del 1,3-bisfosfoglicerato. El isozima citosólico utiliza NAD, al igual que los enzimas glucolíticos de los animales y otros eucariotas y en la oscuridad este isozima actúa en la glucólisis oxidando el gliceraldehído 3-fosfato. Los dos isozimas de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, al igual que todos los enzimas, catalizan la reacción en ambas direcciones.

Una molécula de gliceraldehído 3-fosfato es el producto neto de la ruta de asimilación del carbono. Las otras cinco moléculas de triosa fosfato (15 carbonos) se reordenan en los pasos ❶ a ❾ de la Figura 20-37 para formar tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato (15 carbonos). El último paso de esta conversión requiere un ATP por ribulosa 1,5-bisfosfato, es decir un total de tres ATP. Así, por cada molécula de triosa fosfato producida por la asimilación fotosintética del CO_2 se requieren seis NADPH y nueve ATP.

El NADPH y el ATP se producen en las reacciones de la fotosíntesis dependientes de la luz con aproximadamente la misma razón (2:3) en que son consumidas en el ciclo de Calvin. Nueve moléculas de ATP se convierten en ADP y fosfato en la generación de una molécula de triosa fosfato; ocho de los fosfatos se liberan en forma de P_i que se combinan con ocho ADP para regenerar ATP. El noveno fosfato se incorpora en la propia triosa fosfato. Para convertir el noveno ADP en ATP, se ha de importar una molécula de P_i del citosol tal como veremos más adelante.

En la oscuridad, cesa la producción de ATP y NADPH por la fotofosforilación y también se detiene la incorporación de CO_2 en triosa fosfato antes conocidas como reacciones oscuras). Las "reacciones oscuras" de la fotosíntesis se denominaron de este modo para distin-

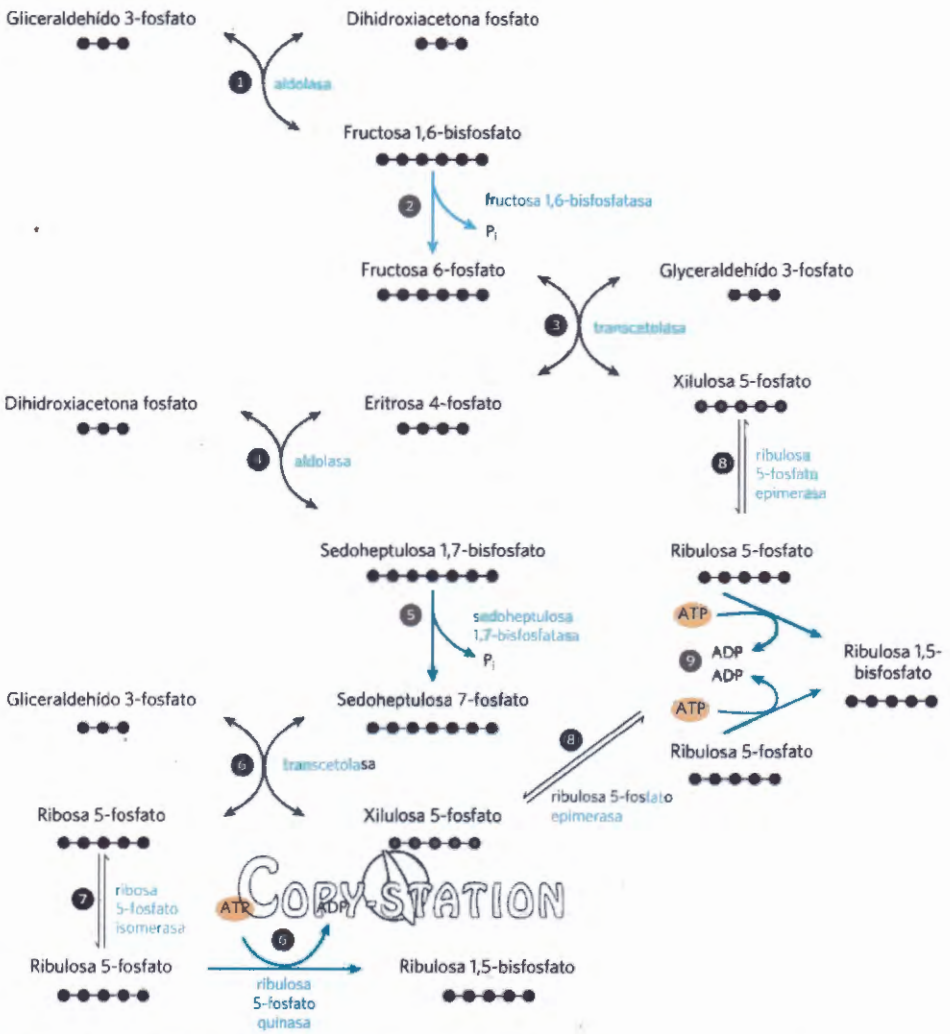


FIGURA 20-37 Tercera fase de la asimilación de CO_2. Este diagrama esquemático muestra las interconversiones de las triosas fosfato y las pentosas fosfato. Los círculos negros representan el número de carbonos de cada compuesto. Los materiales de partida son el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Las reacciones catalizadas por la aldolasa (1 y 4) y la transcetolasa (3 y 6) producen pentosas fosfato que se convierten en ribulosa 1,5-bisfosfato—ribosa 5-fosfato por la ribosa 5-fosfato isomerasa (7) y en xilulosa 5-fosfato por la ribulosa 5-fosfato epimerasa (8). En el paso 9 la ribulosa 5-fosfato es fosforilada, regenerando ribulosa 1,5-bisfosfato. Los pasos con flechas azules son exergónicos y hacen que el proceso en su conjunto sea irreversible: pasos 2 (fructosa 1,6-bisfosfatasa), 5 (sedoheptulosa bisfosfatasa) y 9 ribulosa 5-fosfato quinasa.

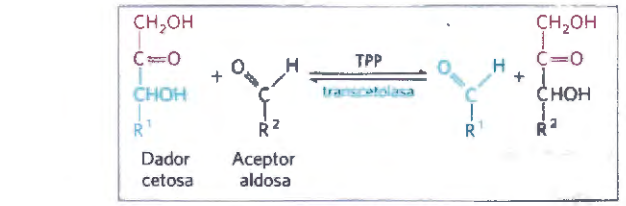
guirlas de las reacciones *primarias*, impulsadas por la luz, de transferencia de electrones al $NADP^+$ y de síntesis de ATP. De hecho, en la oscuridad estas reacciones no transcurren a velocidades significativas por lo que estas reacciones se denominan con mayor propiedad reacciones de asimilación de carbono. Describiremos más adelante en esta sección los mecanismos reguladores que ponen en marcha la asimilación de carbono en presencia de luz y que la detienen en la oscuridad.

Dentro del estroma del cloroplasto se encuentran todos los enzimas necesarios para convertir las triosas fosfato producidas por la asimilación del CO_2 (gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) en almidón, que se almacena temporalmente en el cloroplasto en forma de gránulos insolubles. La aldolasa condensa las triosas a fructosa 1,6-bisfosfato; la fructosa 1,6-bisfosfatasa produce fructosa-6-fosfato; la fosfohexosa isomerasa da glucosa 6-fosfato y la fosfoglucomutasa produce glucosa 1-fosfato, material de partida para la síntesis de almidón (véase la Sección 20.7).

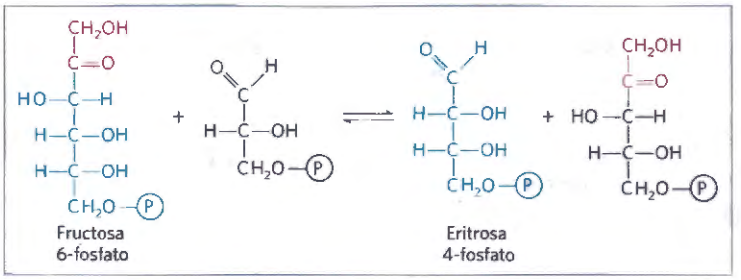
Todas las reacciones del ciclo de Calvin, excepto las catalizadas por la rubisco, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y la ribulosa 5-fosfato quinasa, también tienen lugar en tejidos animales. Debido a la falta de estos tres enzimas los animales no pueden llevar a cabo la conversión neta de CO_2 en glucosa.

Un sistema de transporte exporta triosas fosfato desde el cloroplasto e importa fosfato

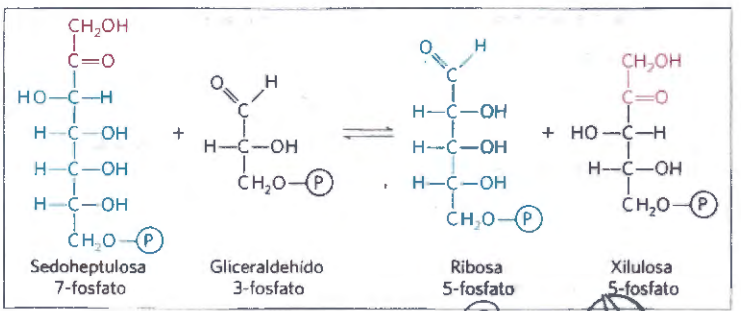
La membrana interna del cloroplasto es impermeable a la mayoría de compuestos fosforilados, entre ellos fructosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato. Hay, sin embargo, un cotransportador antiparalelo específico que cataliza el intercambio, uno por uno, de P_i con una triosa fosfato, ya sea dihidroxiacetona fosfato, o 3-fosfoglicerato (**Fig. 20-42**; véase también la Fig. 20-36). Este cotransportador antiparalelo traslada simultáneamente P_i al interior del cloroplasto, donde es utilizado en la fotofosforilación, y triosa fosfato fuera del



(a)



(b)



(c)

FIGURA 20-38 Reacciones catalizadas por la transcetolasa en el ciclo de Calvin. **(a)** Reacción general catalizada por la transcetolasa: la transferencia de un grupo de dos carbonos, transportado temporalmente por un TPP ligado al enzima, desde una cetosa dadora a una aldosa aceptora. **(b)** Conversión de una hexosa y una triosa en una pentosa y una tetrosa (paso ❸ de la Fig. 20-37). **(c)** Conversión de azúcares de siete y tres carbonos en dos pentosas (paso ❻ de la Fig. 20-37).

COPY-STATION

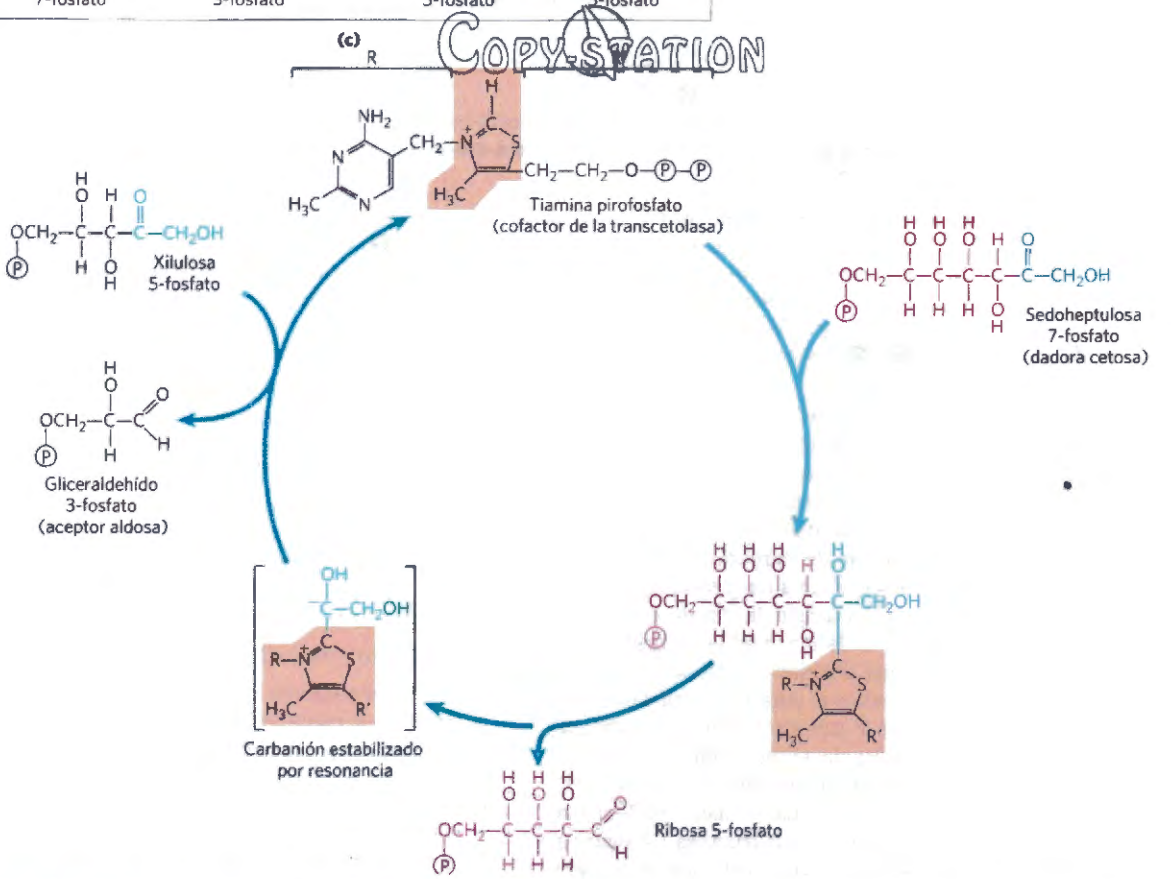


FIGURA 20-39 El TPP como cofactor de la transcetolasa. La transcetolasa transfiere un grupo de dos carbonos desde la sedoheptulosa 7-fosfato al gliceraldehído 3-fosfato produciendo dos pentosas fosfato (paso ❻ de la Fig. 20-37). La tiamina pirofosfato actúa como transportador temporal de la unidad de dos carbonos y como sumidero electrónico (véase la Fig. 14-15) para facilitar la reacción aquí mostrada.

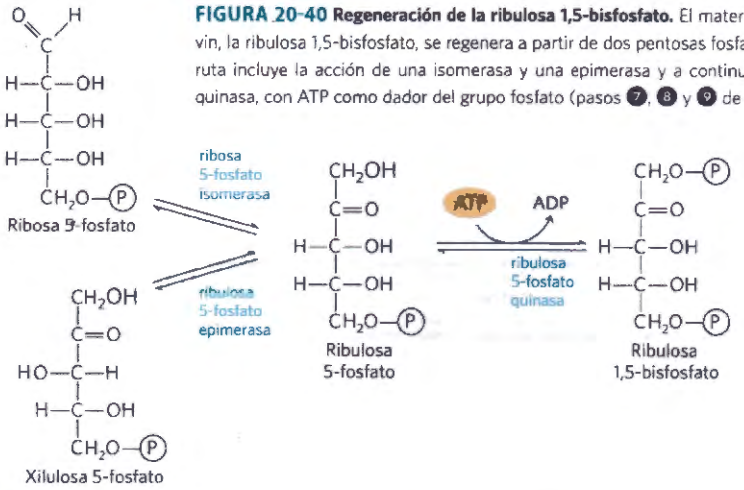


FIGURA 20-40 Regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato. El material de partida del ciclo de Calvin, la ribulosa 1,5-bisfosfato, se regenera a partir de dos pentosas fosfato producidas en el ciclo. Esta ruta incluye la acción de una isomerasa y una epimerasa y a continuación la fosforilación por una quinasa, con ATP como dador del grupo fosfato (pasos ❼, ❽ y ❾ de la Fig. 20-37).

cloroplasto hacia el citosol donde se puede utilizar para sintetizar sacarosa que es la forma en la que se transporta el carbono fijado a tejidos de la planta alejados.

La síntesis de sacarosa en el citosol y la síntesis de almidón en el cloroplasto son las rutas principales de "recolección" del exceso de triosas fosfato de la fotosíntesis. La síntesis de sacarosa (descrita más adelante) libera cuatro moléculas de P_i de las cuatro triosas fosfato necesarias para producir sacarosa. Por cada molécula de triosa fosfato eliminada del cloroplasto, se transporta un P_i a su interior, lo que proporciona la novena molécula de P_i mencionada anteriormente que se utiliza para regenerar el ATP. Si se bloquease este intercambio, la síntesis de triosa fosfato pronto agotaría el P_i disponible en el cloroplasto con lo que la síntesis de ATP sería más lenta y se suprimiría la asimilación de CO_2 en almidón.

Este sistema de cotransporte antiparalelo P_i-triosa fosfato cumple una función adicional. En el citosol se necesita ATP y poder reductor para diversas reacciones sintéticas que requieren energía. Estos requerimientos son atendidos hasta un grado todavía no determinado por las mitocondrias pero una segunda fuente potencial de energía son el ATP y el NADPH generados en el estroma del cloroplasto durante las reacciones dependientes de la luz. Sin embargo, ni el ATP y ni el NADPH pueden cruzar la membrana del cloroplasto. El sistema de cotransporte antiparalelo P_i-triosa fosfato tiene el efecto indirecto de trasladar equivalentes de ATP y equivalentes de reducción desde el cloroplasto al citosol **(Fig. 20-43)**. La dihidroxiacetona fosfato formada en el estroma se transporta al citosol en donde se convierte mediante enzimas glucolíticos en 3-fosfoglicerato con formación de ATP y NADH. El 3-fosfoglicerato vuelve a entrar en el cloroplasto completando el ciclo.

COPYRIGHT

Cuatro enzimas del ciclo de Calvin son activados indirectamente por la luz

La asimilación reductora del CO_2 requiere mucho ATP y NADPH aumentando sus concentraciones en el estroma

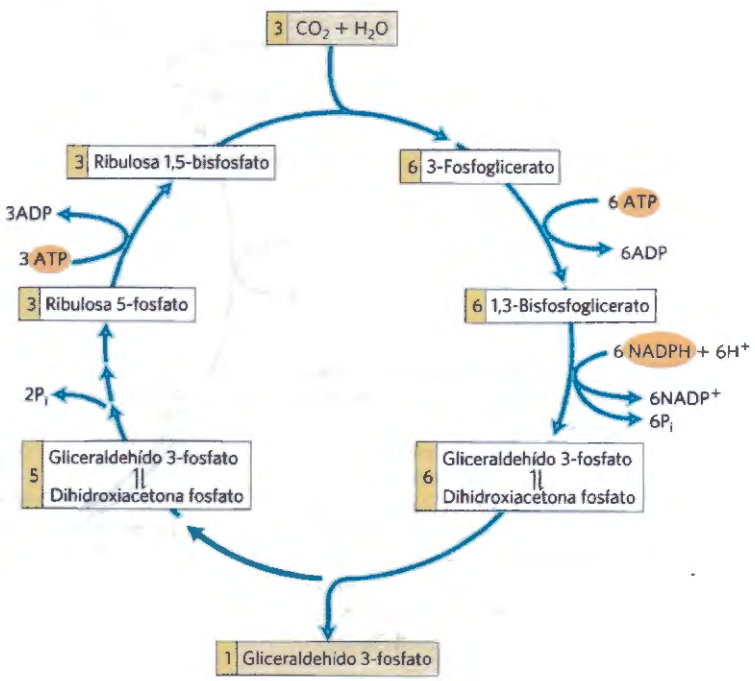


FIGURA 20-41 Estequiometría de la asimilación de CO_2 en el ciclo de Calvin. Por cada tres moléculas de CO_2 fijadas, se produce una molécula de triosa fosfato (gliceraldehído 3-fosfato) y se consumen nueve ATP y seis NADPH.

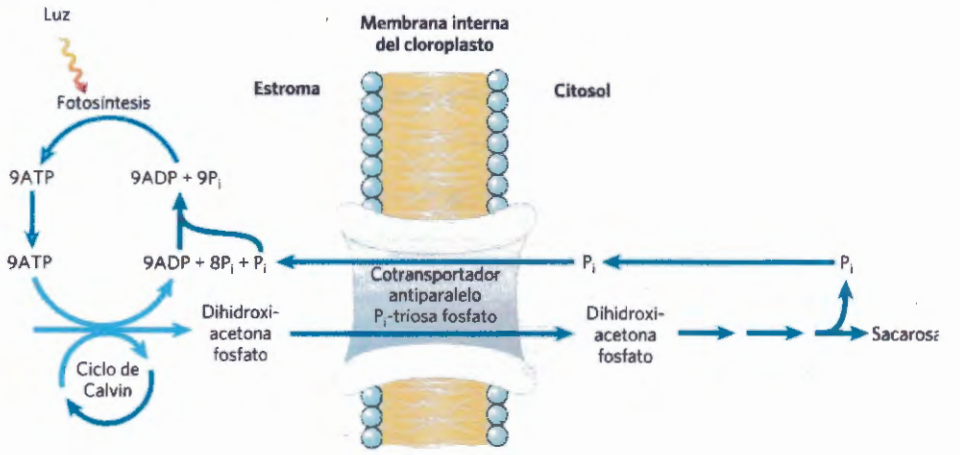


FIGURA 20-42 Sistema de cotransprote antiparalelo P_i-triosa fosfato de la membrana interna del cloroplasto. Este transportador facilita el intercambio de P_i citosólico por dihidroxiacetona fosfato del estroma. Los productos de la asimilación fotosintética del carbono se transportan de este modo al citosol en donde se utilizan como material de partida para la biosíntesis de sacarosa, mientras que el P_i requerido para la fotofosforilación pasa al estroma. Este mismo sistema de cotransporte antiparalelo puede transportar 3-fosfoglicerato y actúa indirectamente exportando ATP y equivalentes de reducción (véase la Fig. 20-43).

cuando se iluminan los cloroplastos **(Fig. 20-44)**. El transporte de protones inducido por la luz a través de la membrana del tilacoide también aumenta el pH del estroma, de 7 hasta aproximadamente 8, acompañado de un flujo de Mg^{2+} desde el compartimiento del tilacoide hacia el estroma aumentando la $[Mg^{2+}]$ desde 1-3 mM a 3-6 mM. Varios enzimas del estroma han evolucionado de forma que pueden aprovecharse de estas condiciones inducidas por la luz que indican la disponibilidad de ATP y NADPH: estos enzimas son más activos en un ambiente alcalino y de alta $[Mg^{2+}]$. Por ejemplo, la activación de la rubisco por formación de la carbamil-lisina es más rápida a pH alcalino, y la alta $[Mg^{2+}]$ en el estroma favorece la formación del complejo enzima-Mg^{2+} activo. La fructosa 1,6-bisfosfatasa requiere Mg^{2+} y es muy dependiente del pH **(Fig. 20-45)**; su actividad se incre-

COPY-STATION

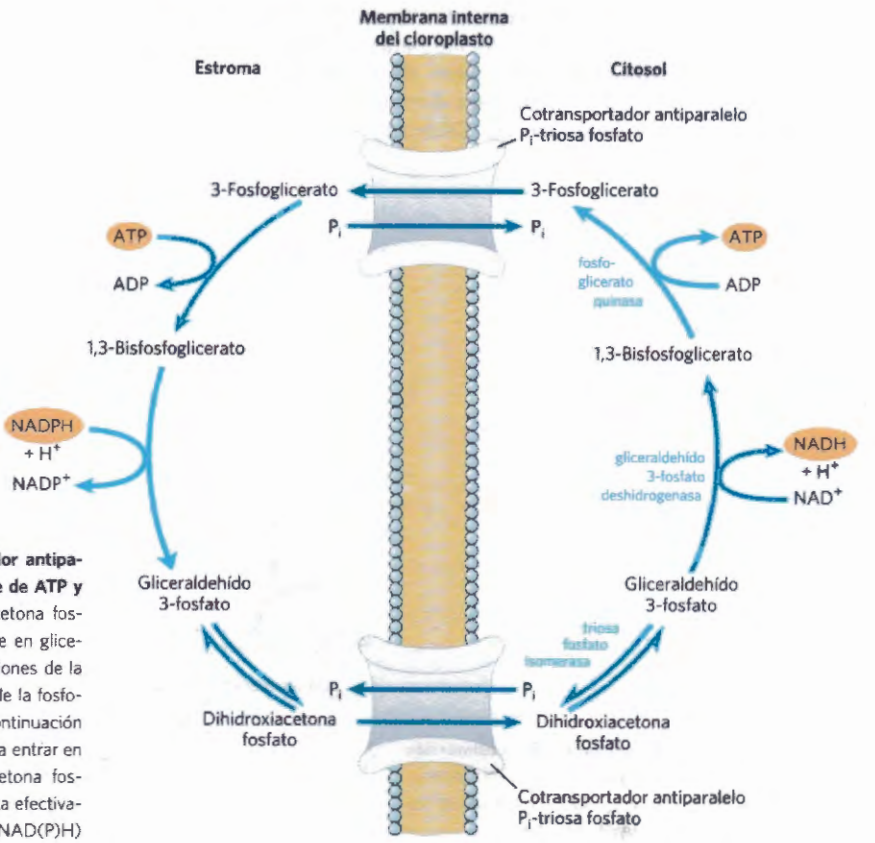


FIGURA 20-43 Papel del cotransportador antiparalelo de P_i-triosa fosfato en el transporte de ATP y equivalentes de reducción. La dihidroxiacetona fosfato abandona el cloroplasto y se convierte en gliceraldehído 3-fosfato en el citosol. Las reacciones de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y de la fosfoglicerato quinasa citosólicas producen a continuación NADH, ATP y 3-fosfoglicerato. Éste vuelve a entrar en el cloroplasto reduciéndose a dihidroxiacetona fosfato, lo que completa un ciclo que transporta efectivamente ATP y equivalentes de reducción (NAD(P)H) desde el cloroplasto al citosol.

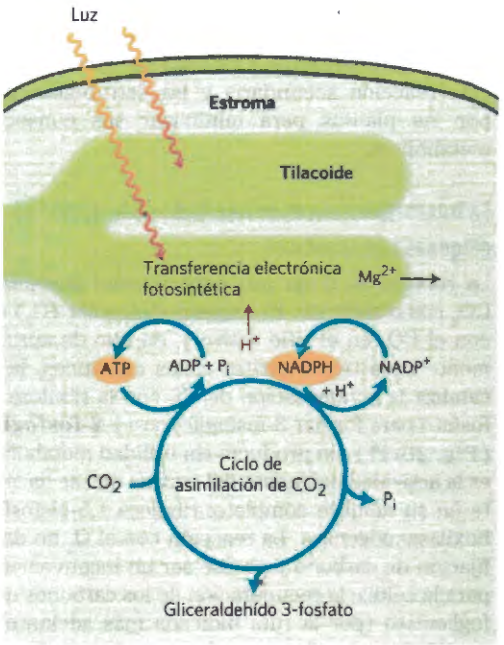


FIGURA 20-44 Fuente de ATP y NADPH. El ATP y NADPH producidos por las reacciones dependientes de la luz son sustratos esenciales para la reducción del CO_2. Las reacciones fotosintéticas que producen ATP y NADPH van acompañadas del movimiento de protones (rojo) desde el estroma al tilacoide, creando condiciones alcalinas en el estroma. Pasan iones Mg^{2+} desde el tilacoide al estroma con lo que aumenta la $[Mg^{2+}]$ del estroma.

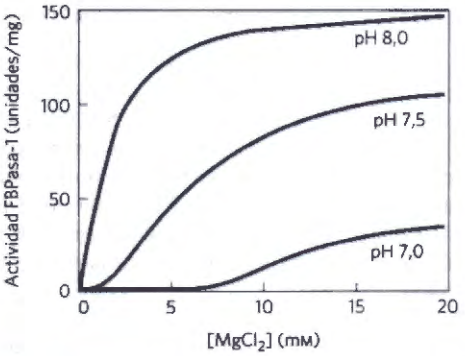


FIGURA 20-45 Activación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa del cloroplasto. La fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) reducida es activada por la luz y una combinación de pH elevado y alta $[Mg^{2+}]$ en el estroma, ambos producidos por la iluminación. [Fuente: Información de B. Halliwell, *Chloroplast Metabolism: The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, p. 97, Clarendon Press, 1984.]

menta en un factor de más de 100 cuando el pH y la $[Mg^{2+}]$ aumentan durante la iluminación de los cloroplastos.

Cuatro enzimas del ciclo de Calvin están sujetos a un tipo especial de regulación por la luz. La ribulosa 5-fosfato quinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa son activadas mediante una reducción inducida por la luz de los puentes disulfuro entre dos residuos Cys esenciales para sus actividades catalíticas. Cuando estos residuos Cys están formando puentes disulfuro (oxidados) los enzimas son inactivos; ésta es la situación normal en la oscuridad. Con la iluminación los electrones fluyen desde el fotosistema I a la ferredoxina (véase la Fig. 20-16) que pasa electrones a una proteína pequeña y soluble que contiene disulfuros denominada **tiorredoxina (Fig. 20-46)**, en una reacción catalizada por la **ferredoxina-tiorredoxina reductasa.** La tiorredoxina reducida cede electrones para la reducción de los puentes disulfuro de los enzimas activados por la luz, y estas reacciones de rotura reductora van acompañadas de cambios de conformación que aumentan la actividad de los enzimas. Al ano-chesedos residuos Cys de los cuatro enzimas se reoxidan a su forma disulfuro, los enzimas quedan inactivados y no se consume ATP en la asimilación de CO_2. En su lugar, el almidón sintetizado y almacenado durante el día se degrada como combustible para la glucólisis durante la noche.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, primer enzima de la ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato también está regulada por este mecanismo de reducción impulsado por la luz, pero en el sentido opuesto. Durante el día, cuando la fotosíntesis produce grandes cantidades de NADPH, este enzima no es necesario para la producción de NADPH. La reducción de un enlace disulfuro esencial por electrones de la ferredoxina *inactiva* el enzima.

COPY STATION

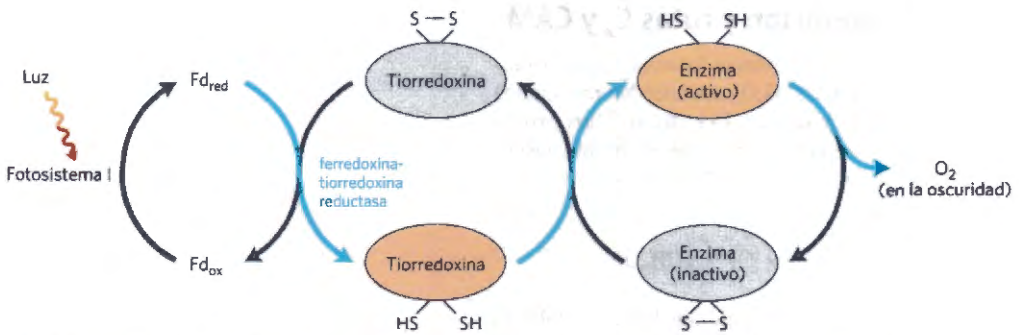


FIGURA 20-46 Activación por la luz de varios enzimas del ciclo de Calvin. La activación por la luz está facilitada por la tiorredoxina, una proteína pequeña que contiene grupos disulfuro. Con la luz, la tiorredoxina es reducida por electrones que se desplazan desde el fotosistema I a través de la ferredoxina (Fd) (flechas azules); a continuación la tiorredoxina reduce los enlaces disulfuro críticos en los enzimas sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa ribulosa 5-fosfato quinasa y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, activando así estos enzimas. En la oscuridad los grupos -SH se reoxidan a disulfuros inactivando los enzimas.

RESUMEN 20.5 Reacciones de asimilación del carbono

- En los eucariotas la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos. En las reacciones de asimilación de CO_2 (ciclo de Calvin), se utiliza ATP y NADPH para reducir el CO_2 a triosas fosfato. Estas reacciones tienen lugar en tres fases: la reacción de fijación propiamente dicha catalizada por la rubisco; la reducción del 3-fosfoglicerato resultante a gliceraldehído 3-fosfato y la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de las triosas fosfato.
- La rubisco condensa CO_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato formando una hexosa bisfosfato inestable que se rompe dando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. La rubisco es activada por modificación covalente (carbamilación de la Lys^{201}) catalizada por la rubisco activasa y es inhibida por un análogo natural del estado de transición, cuyas concentraciones aumentan en la oscuridad y disminuyen con la luz del día.
- Isozimas de los enzimas glucolíticos que se encuentran en el estroma catalizan la reducción del 3-fosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato; la reducción de cada molécula requiere un ATP y un NADPH.
- Enzimas del estroma, entre ellos la transcetolasa y la aldolasa, reordenan los esqueletos carbonados de las triosas fosfato generando intermediarios de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos dando finalmente pentosas fosfato. Las pentosas fosfato se convierten en ribulosa 5-fosfato que a continuación se fosforila dando ribulosa 1,5-bisfosfato lo que completa el ciclo de Calvin.
- El coste para la fijación de tres CO_2 en forma de triosa fosfato es de nueve ATP y seis NADPH que son proporcionados por las reacciones de la fotosíntesis dependientes de la luz.
- Un cotransportador antiparalelo de la membrana interna del cloroplasto intercambia P_i en el citosol por 3-fosfoglicerato o dihidroxiacetona fosfato producidos por la asimilación de CO_2 en el estroma. La oxidación de la dihidroxiacetona fosfato en el citosol genera ATP y NADH transportando así ATP y equivalentes de reducción desde el cloroplasto al citosol.
- Cuatro enzimas del ciclo de Calvin son activados indirectamente por la luz y son inactivos en la oscuridad, de manera que la síntesis de hexosa no compite con la glucólisis, que es necesaria para obtener energía en la oscuridad.

20.6 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM

Tal como hemos visto, las células fotosintéticas producen O_2 (por la escisión del H_2O) durante las reacciones impulsadas por la luz y utilizan CO_2 durante los procesos independientes de la luz por lo que el cambio gaseoso neto durante la fotosíntesis es la captación de CO_2 y la liberación de O_2:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow O_2 + (CH_2O)$$

En la oscuridad, las plantas también llevan a cabo la **respiración mitocondrial**, la oxidación de sustratos a CO_2 y la conversión del O_2 en H_2O. Existe aun otro proceso en las plantas que, al igual que la respiración mitocondrial, consume O_2 y produce CO_2 y, al igual que la fotosíntesis, está impulsado por la luz. Este proceso, la **fotorrespiración,** es una reacción secundaria costosa de la fotosíntesis, debida a la falta de especificidad del enzima rubisco. En esta sección describiremos esta reacción secundaria y las estrategias utilizadas por las plantas para minimizar sus consecuencias metabólicas.

La fotorrespiración es el resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco

La rubisco no tiene una especificidad absoluta por el CO_2 como sustrato. El oxígeno molecular (O_2) compite con el CO_2 en el sitio activo y, en uno de aproximadamente cada tres o cuatro ciclos catalíticos, la rubisco cataliza la condensación del O_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato y **2-fosfoglicolato (Fig. 20-47)**, un producto sin utilidad metabólica. Ésta es la actividad oxigenasa del enzima que se hace evidente en su nombre completo: ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. La reacción con el O_2 no da lugar a fijación de carbono y parece ser un inconveniente neto para la célula; la recuperación de los carbonos del 2-fosfoglicolato (por la ruta indicada más adelante) utiliza cantidades significativas de energía celular y libera parte del CO_2 fijado previamente.

COPY-STATION

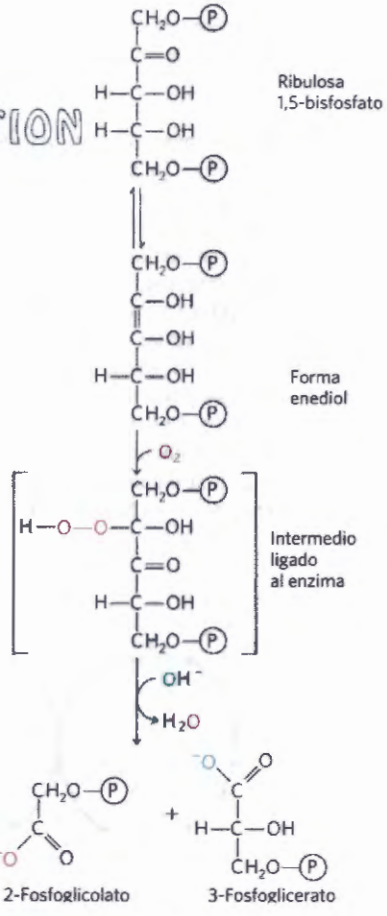


FIGURA 20-47 Actividad oxigenasa de la rubisco. La rubisco puede incorporar O_2 en lugar de CO_2 sobre la ribulosa 1,5-bisfosfato. El intermedio inestable así formado se escinde en 2-fosfoglicolato, (que se recicla tal como se describe en la Fig. 20-48), y 3-fosfoglicerato que puede volver a entrar en el ciclo de Calvin.

Dado que la reacción con el oxígeno es perjudicial para el organismo ¿por qué la evolución de la rubisco produjo un sitio activo incapaz de discriminar bien entre CO_2 y O_2? Quizá gran parte de la evolución tuvo lugar antes del tiempo, hace unos 2.500 millones de años, en que la producción de O_2 por los organismos fotosintéticos empezase a elevar el contenido en oxígeno de la atmósfera. Antes de aquel momento no existía una presión selectiva para que la rubisco discriminase entre el CO_2 y el O_2. La K_m para el CO_2 es de aproximadamente 9 μM y para el O_2 es alrededor de 350 μM. La atmósfera moderna contiene cerca de 20% de O_2 y sólo 0,04% de CO_2 por lo que una solución acuosa en equilibrio con el aire a temperatura ambiente contiene alrededor de 250 μM O_2 y 11 μM CO_2, concentraciones que permiten que la "fijación" de O_2 por la rubisco sea importante y, por consiguiente, constituya un desperdicio de energía significativo. La dependencia de la temperatura de las solubilidades del O_2 y del CO_2 es tal que a temperaturas elevadas la razón O_2:CO_2 en solución aumenta. Además, la afinidad de la rubisco por el CO_2 disminuye al aumentar la temperatura exacerbando la tendencia del enzima a catalizar la inútil reacción de la oxigenasa. Dado que el CO_2 se consume en la reacciones de asimilación, la proporción de O_2 a CO_2 en los espacios aéreos alrededor de la hoja aumenta con lo que aún se favorece más la reacción de la oxigenasa.

La ruta de recuperación del fosfoglicolato es costosa

La **ruta del glicolato** convierte dos moléculas de 2-fosfoglicolato en una molécula de serina (tres carbonos) y una molécula de CO_2 **(Fig. 20-48)**. En el cloroplasto una fosfatasa convierte el 2-fosfoglicolato en glicolato que se exporta al peroxisoma. Allí, el glicolato es oxidado por el oxígeno molecular y el aldheído resultante (glioxilato) se transamina dando glicina. El peróxido de hidrógeno formado como producto secundario de la oxidación del glicolato se vuelve inocuo por acción de las peroxidasas del peroxisoma. La glicina pasa del peroxisoma a la matriz mitocondrial en donde experimenta una descarboxilación oxidativa por el complejo de la glicina descarboxilasa, enzima que es similar en estructura y mecanismo a dos complejos mitocondriales ya encontrados: el complejo de la piruvato deshidrogenasa y el complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa (Capítulo 16). El **complejo de la glicina descarboxilasa** oxida la glicina a CO_2 y NH_3 con la reducción concomitante del NAD^+ a NADH y la transferencia del carbono restante de la glicina al cofactor tetrahidrofolato **(Fig. 20-49)**. La unidad monocarbonada transportada en el tetrahidrofolato se transfiere seguidamente a una segunda glicina por la serina hidroximetiltransferasa, produciendo serina. La reacción neta catalizada por el complejo de la glicina descarboxilasa y la serina hidroximetiltransferasa es

$$2\ \text{Glicina} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

La serina se convierte en hidroxipiruvato, glicerato y, finalmente, en 3-fosfoglicerato que se utiliza para regenerar la ribulosa 1,5-bisfosfato completando este largo, y caro, ciclo (Fig. 20-48).

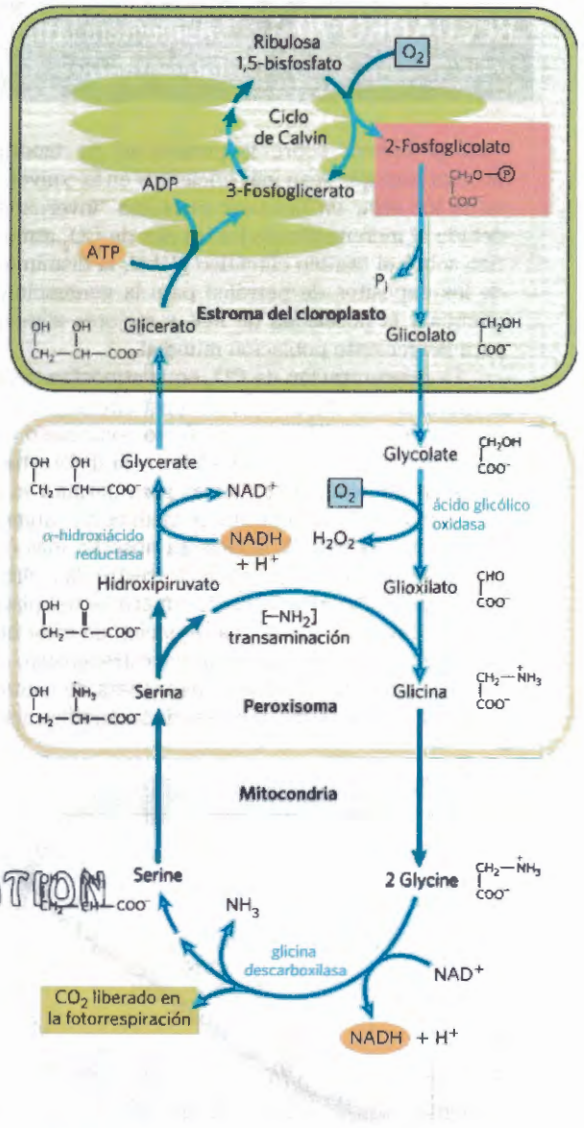


FIGURA 20-48 Ruta del glicolato. En esta ruta, mediante la cual se recupera el 2-fosfoglicolato (sombreado en rosa) convirtiéndolo en serina y, finalmente, en 3-fosfoglicerato intervienen tres compartimientos celulares. El glicolato formado por desfosforilación del 2-fosfoglicolato en los cloroplastos se oxida a glioxilato en los peroxisomas y a continuación se transamina a glicina. En la mitocondria se condensan dos moléculas de glicina formando serina y CO_2, liberado durante la fotorrespiración (sombreado en verde). Esta reacción está catalizada por la glicina descarboxilasa, enzima presente a concentraciones muy elevadas en las mitocondrias de las plantas C_3 (véase el texto). La serina se convierte en hidroxipiruvato y luego en glicerato en los peroxisomas; el glicerato vuelve a entrar en el cloroplasto para ser fosforilado incorporándose al ciclo de Calvin. Durante la fotorrespiración se consume oxígeno en dos pasos (sombreados en azul).

Con una luz solar brillante, el flujo a través de la ruta de recuperación del glicolato puede ser muy elevado y produce CO_2 unas cinco veces más que el que se produce, de forma normal, por todas las oxidaciones del ciclo del ácido cítrico. Para producir este gran flujo, las mitocondrias contienen cantidades enormes del complejo de la glcina descarboxilasa: ¡las cuatro proteínas del complejo constituyen la *mitad* de todas las proteínas de la matriz mitocondrial en las hojas de guisante y de espinaca! En las partes no fotosintéticas de la planta,

RECUADRO 20-1 ¿Aumentará la ingeniería genética la eficiencia de los organismos fotosintéticos?

Tres problemas sobre la posibilidad de modificar plantas para que sean más eficientes en la conversión de la luz solar en biomasa: el efecto "invernadero" debido al incremento de los niveles de CO_2 atmosférico sobre el cambio climático global, la disminución de los depósitos de petróleo para la generación de energía y la necesidad de más y mejores alimentos para la creciente población mundial.

La concentración de CO_2 en la atmósfera terrestre ha aumentado de forma constante durante los últimos 50 años (Fig. 1), un efecto combinado de la utilización de combustibles fósiles y la deforestación y quema de bosques tropicales para permitir el uso de tierra para la agricultura. A medida que aumenta el CO_2 atmosférico, la atmósfera absorbe más calor de radiación de la superficie terrestre del planeta volviéndolo a irradiar hacia la superficie del planeta (y en todas direcciones). La retención de calor eleva la temperatura de la superficie terrestre; en esto consiste el efecto invernadero. Una manera de limitar el aumento del CO_2 atmosférico sería la modificación de plantas o microorganismos para dotarlos de una mayor capacidad para secuestrar el CO_2.

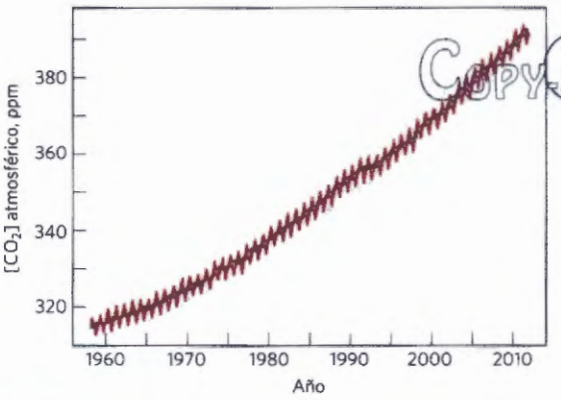


FIGURA 1 Concentración de CO_2 en la atmósfera medido en el Mauna Loa Observatory en Hawaii. Datos de la National Oceanic and Atmospheric Administration y Scripps Institution of Oceanography CO_2 Program.

Se calcula que la cantidad total de carbono en todos los sistemas terrestres (atmósfera, suelo, biomasa) es de unas 3.200 gigatoneladas (GT), o sea 3,2 billones de toneladas métricas. La atmósfera contiene 760 GT más de CO_2.

El flujo de carbono a través de estos reservorios terrestres (Fig. 2) se debe en su mayor parte a las actividades fotosintéticas de las plantas y las actividades de degradación por parte de microorganismos. Las plantas fijan unas 123 GT de carbono anualmente, e inmediatamente liberan aproximadamente la mitad a la atmósfera por la respiración. Gran parte del resto se libera gradualmente a la atmósfera por acción microbiana sobre materiales vegetales muertos, pero la biomasa queda secuestrada en forma de plantas leñosas y árboles durante décadas o siglos. El flujo de carbono antropogénico, la cantidad de CO_2 liberado a la atmósfera debido a actividades humanas, es de 9 GT al año, poco en comparación con la biomasa total, pero suficiente para inclinar el equilibrio de la naturaleza hacia un aumento de CO_2 en la atmósfera. Se calcula que los bosques de América del Norte secuestran 0,7 GT de carbono anualmente, lo que representa una décima parte de la producción anual *global* de CO_2 a partir de combustibles fósiles. Está claro que el mantenimiento de los bosques y la reforestación son formas efectivas de limitar el flujo de CO_2 de vuelta a la atmósfera.

Otra manera de limitar el aumento de CO_2 atmosférico, al tiempo que se aborda la necesidad de reemplazar los cada vez más escasos combustibles fósiles, es el uso de la biomasa renovable como fuente de etanol para reemplazar los combustibles fósiles en los motores de combustión interna. Esto reduce el movimiento *unidireccional* del carbono desde los combustibles fósiles a la reserva atmosférica de CO_2, para reemplazarlo con el flujo *cíclico* de CO_2 desde el etanol al CO_2 y de nuevo a loa biomasa. Cuando el maíz, el trigo o *Panicum virgatum* fermentan a etanol para ser usado como combustible, todo incre-

tales como los tubérculos de las patatas, las mitocondrias contienen concentraciones muy bajas del complejo de la glicina descarboxilasa.

La actividad combinada de la rubisco oxigenasa y la ruta de recuperación del glicolato consume O_2 y produce CO_2, de ahí el nombre de fotorrespiración. Quizá un nombre mejor para esta ruta sería **ciclo fotosintético oxidativo del carbono** o **ciclo C_2**, nombres que no invitan a la comparación con la respiración en las mitocondrias. A diferencia de la respiración mitocondrial, la fotorrespiración no conserva energía y puede, de hecho, inhibir la formación neta de biomasa hasta en un 50%. Esta ineficiencia ha llevado a adaptaciones evolutivas en los procesos de asimilación de carbono, especialmente en plantas que han aparecido en climas cálidos. La ineficiencia aparente de la rubisco, y su efecto en la limitación de la producción de biomasa, ha inspirado esfuerzos para obtener mediante ingeniería genética una rubisco "mejor", pero este objetivo, de momento, aún no se ha conseguido (Recuadro 20-1).

En las plantas C_4, la fijación del CO_2 y la actividad rubisco tienen lugar en espacios separados

En muchas plantas que crecen en los trópicos (así como las plantas cultivadas en zonas templadas pero de origen tropical tales como el maíz, la caña de azúcar y el

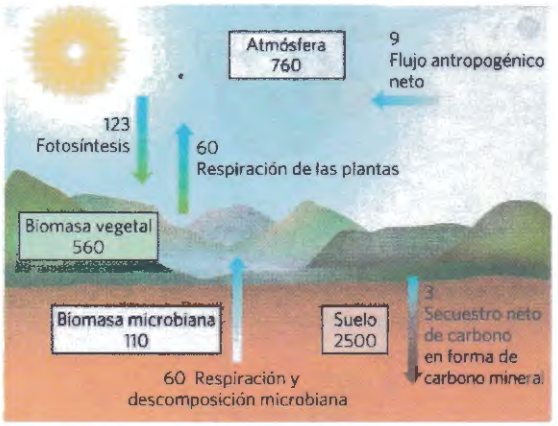


FIGURA 2 Ciclo del carbono terrestre. Los depósitos de carbono (recuadros) se dan en gigatoneladas (GT) y los flujos (flechas) se dan en GT por año. La biomasa animal aquí es negligible, menos de 0,5 GT. [Fuente: Información de C. Jansson et al., *BioScience* 60:683, 2010, Fig. 1].

mento en la producción de biomasa debido a una fotosíntesis más eficiente debería resultar en una disminución correspondiente en el uso de combustibles fósiles.

Finalmente, la modificación de las cosechas de alimento con un rendimiento mayor de alimento por hectárea, o por hora de trabajo, podría mejorar la nutrición humana en todo el planeta.

En principio, estos objetivos podrían conseguirse desarrollando una rubisco que no catalizase la despilfarradora reacción con O_2, o aumentando el número de recambio de la rubisco, o aumentando la cantidad de rubisco u otros enzimas de la vía de fijación de carbono. Ya hemos dicho que la rubisco es un enzima de una ineficiencia poco común, con un número de recambio de 3 s^{-1} a 25 °C; la mayoría de enzimas tienen números de recambio que son órdenes de magnitud más elevados. También cataliza la inútil reacción con oxígeno que aún reduce más su eficiencia en la fijación de CO_2 y producción de biomasa. Si se pudiese modificar genéticamente la rubisco para obtener un número de recambio más elevado o hacerla más selectiva al CO_2 en relación al O_2 ¿sería el efecto una mayor producción fotosintética de biomasa y, por tanto, un mayor secuestro de CO_2, mayor producción de combustible no fósil y una mejora en la nutrición?

Ya comentamos en el Capítulo 15 que la visión tradicional de las rutas metabólicas sostiene que algún paso en cualquier ruta es el más lento y, por consiguiente, es el factor limitante del flujo de material a través de la ruta. No obstante, grandes esfuerzos destinados a modificar células u organismos para producir mayor cantidad del enzima "limitante" de una ruta han tenido a menudo resultados descorazonadores; organismos modificados muestran a menudo muy poco cambio, si lo hay, en el flujo a través de aquella ruta. El ciclo de Calvin es un caso ilustrativo. El aumento de la cantidad de rubisco en las células vegetales mediante ingeniería genética no tiene efecto, o muy poco, sobre la velocidad de conversión del CO_2 en glúcido. De modo parecido, cambios en la cantidad de enzimas que se sabe son regulados por la luz y, por tanto, candidatos a tener un papel clave en la regulación de la asimilación de CO_2 (fructosa 1,6-bisfosfatasa, 3-fosfoglicerato quinasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) tampoco mejoran de manera significativa la velocidad de la fotosíntesis. Sin embargo, el cambio en la cantidad de sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa, un enzima que no se cree tenga un papel regulador, tiene un impacto significativo sobre la fotosíntesis. El análisis de control metabólico (Sección 15.2) sugiere que este resultado no es inesperado; en el organismo vivo, las rutas pueden estar limitadas por más de un paso ya que cada cambio en un paso da lugar a cambios compensatorios en otros pasos. La determinación cuidadosa del coeficiente de control de flujo (véase el Recuadro 15-1) ayuda a identificar qué enzimas de una ruta han de ser el objetivo de la ingeniería genética. ¡Es evidente que los ingenieros genéticos y los analistas de control metabólico necesitarán trabajar conjuntamente para solucionar problemas como éste!

sorgo) se ha desarrollado un mecanismo para evitar el problema de la fotorrespiración despilfarradora. El paso en el que el CO_2 se fija en un producto de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato, está precedido de varios pasos, uno de los cuales es una fijación temporal del CO_2 sobre un compuesto de cuatro carbonos. Las plantas que utilizan este proceso son conocidas como **plantas C_4**, y el proceso de asimilación como **metabolismo C_4** o **ruta C_4**. Las plantas que utilizan el método de asimilación de carbono que hemos descrito hasta el momento, en las que el *primer paso* es la reacción del CO_2 con la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato, se denominan plantas C_3.

Las plantas C_4, que, típicamente, crecen en condiciones de altas intensidades luminosas y temperatura elevada, tienen varias características importantes: alta velocidad fotosintética, alta velocidad de crecimiento, baja tasa de fotorrespiración, baja tasa de pérdida de agua y una estructura especializada de la hoja. En la fotosíntesis que tiene lugar en las hojas de las plantas C_4 intervienen dos tipos de células: células mesófilas y células túnico-vasculares **(Fig. 20-50a)**. Existen tres variantes del metabolismo C_4 descubierto en la década de 1960 por Marshall Hatch y Rodger Slack (Fig. 20-50b).

En las plantas de origen tropical el primer intermediario en el que se ha fijado el $^{14}CO_2$ es el oxalacetato,

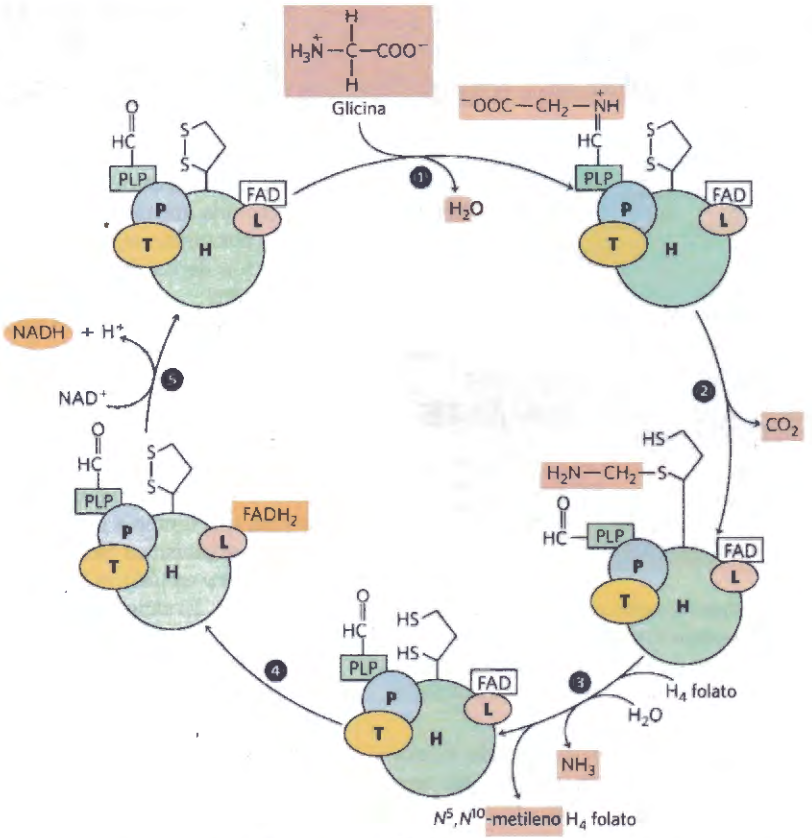


FIGURA 20-49 Sistema de la glicina descarboxilasa. La glicina descarboxilasa de las mitocondrias de las plantas es un complejo formado por cuatro tipos de subunidades, con la siguiente estequiometría $P_4H_{27}T_9L_2$. La proteína H tiene un residuo de ácido lipoico unido covalentemente que puede experimentar oxidación reversible. ❶ Se forma de una base de Schiff entre el piridoxal fosfato (PLP) y glicina, catalizada por la proteína P (así denominada porque contiene PLP). ❷ La proteína P cataliza la descarboxilación oxidativa de la glicina, liberando CO_2; el grupo metilamino restante se une a uno de los grupos –SH del ácido lipoico reducido. ❸ La proteína T (que utiliza tetrahidrofolato, H_4 folato, como cofactor) libera ahora NH_3 de la porción metilamina y transfiere el fragmento monocarbonado restante al tetrahidrofolato, produciendo N^5N^{10}-metileno tetrahidrofolato. ❹ La proteína L oxida los dos grupos –SH del ácido lipoico a disulfuro ❺ pasando electrones al NAD^+ a través el FAD, completando así el ciclo. El N^5N^{10}-metilenotetrahidrofolato formado en este proceso es utilizado por la serina hidroximetiltransferasa para convertir una molécula de glicina en serina, regenerando el tetrahidrofolato que es esencial para la reacción catalizada por la proteína T. La subunidad L de la glicina descarboxilasa es idéntica a la dihidrolipoil deshidrogenasa (E_3) de la piruvato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa (véase la Fig. 16-6).

COPY-STATION

un compuesto de cuatro carbonos. Esta reacción, que tiene lugar en el citosol de las células mesófilas de las hojas, está catalizada por la **fosfoenolpiruvato carboxilasa**, cuyo sustrato es el HCO_3^- y no el CO_2. El oxalacetato así formado se reduce a malato a expensas de NADPH (tal como se muestra en la Fig. 20-50b) o se convierte en aspartato por transaminación:

Oxalacetato + α-aminoácido ⟶
L-aspartato + α-cetoácido

El malato o el aspartato formados en las células mesófilas pasa seguidamente a las células túnico-vasculares vecinas a través de plasmodesmos que son canales revestidos de proteína que conectan dos células vegetales y proporcionan una vía para el movimiento de metabolitos e, incluso, proteína pequeñas entre células. En las células túnico-vasculares el malato se oxida y después se descarboxila dando piruvato y CO_2 por acción del **enzima málico**, con reducción de $NADP^+$. En las plantas que utilizan el aspartato como transportador de CO_2, el aspartato se transamina primeramente para formar oxalacetato, que seguidamente se reduce a malato y, a continuación, se libera CO_2 por el enzima málico o la PEP carboxiquinasa. Tal como se ha demostrado mediante experimentos de marcado, el CO_2 libre formado en las células túnico-vasculares es la misma molécula de CO_2 que se fijó originariamente en el oxalacetato en las células mesófilas. Este CO_2 es fijado de nuevo, en esta ocasión por la rubisco, en exactamente la misma reacción que se da en las plantas C_3: incorporación de CO_2 en el C-1 del 3-fosfoglicerato.

El piruvato formado en la descarboxilación del malato en las células túnico-vasculares se vuelve a transferir a las células mesófilas, donde se convierte en PEP mediante una reacción enzimática poco habitual catalizada por la **piruvato fosfato diquinasa** (Fig. 20-50b). Este enzima se denomina diquinasa porque se fosforilan simultáneamente dos moléculas diferentes a partir de una molécula de ATP: el piruvato se fosforila a PEP y el fosfato a pirofosfato. El pirofosfato es hidrolizado posteriormente a fosfato, por lo que se utilizan dos grupos fosfato de alta energía del ATP en la regeneración del PEP. El PEP está ahora a punto para fijar otra molécula de CO_2 en la célula mesófila.

La PEP carboxilasa de las células mesófilas tiene una elevada afinidad por el HCO_3^-, (que está favorecido respecto al CO_2 en solución acuosa) por lo que puede fijar CO_2 de forma más eficiente que la rubisco. A diferencia de la rubisco, no utiliza O_2 como sustrato alternativo, por lo que no hay competencia entre CO_2 y O_2. La reacción de la PEP carboxilasa sirve, pues, para fijar y concentrar CO_2 en forma de malato. La liberación de CO_2 del malato en las células túnico-vasculares produce una concentración local de CO_2 suficientemente elevada para que la rubisco funcione casi a máxima velocidad y para que se suprima la actividad oxigenasa del enzima.

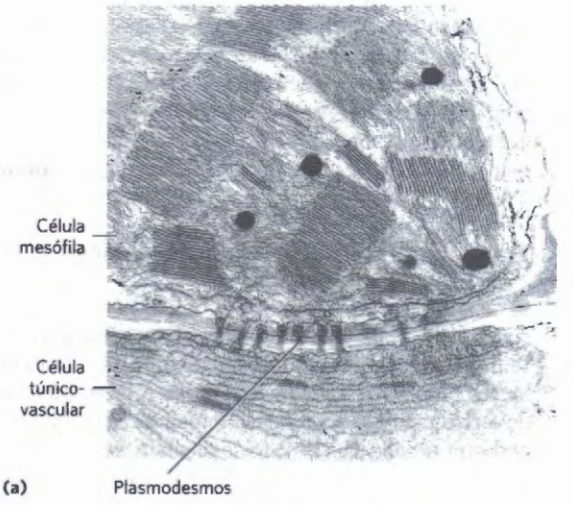
Una vez fijado el CO_2 en forma de 3-fosfoglicerato en las células túnico-vasculares, las restantes reacciones del ciclo de Calvin tienen lugar exactamente en la forma antes descrita. Así, en las plantas C_4 las células mesófilas llevan a cabo la fijación de CO_2 a través de la ruta C_4, mientras que la biosíntesis de sacarosa y de almidón se da en las células túnico-vasculares por la ruta C_3.

Tres enzimas de la ruta C_4 están regulados por la luz mostrando mayor actividad a la luz del día. La malato deshidrogenasa es activada por el mecanismo de reducción dependiente de la tiorredoxina mostrado en la Figura 20-46; la PEP carboxilasa es activada por fosforilación de un residuo Ser y la piruvato fosfato diquinasa es activada por desfosforilación. En estos dos últimos casos no se conocen los detalles sobre la forma en que la luz afecta la fosforilación y la desfosforilación.

La ruta de asimilación de CO_2 en las plantas C_4 tiene un coste energético superior que en las plantas C_3. Por cada molécula de CO_2 asimilada en la ruta C_4, se ha de regenerar una molécula de PEP a expensas de dos grupos fosfoanhídrido de alta energía del ATP. Así, las plantas C_4 necesitan un total de cinco ATP para fijar una molécula de CO_2, mientras que las plantas C_3 sólo necesitan tres (nueve por triosa fosfato). Cuando aumenta la temperatura (y la afinidad de la rubisco por el CO_2 disminuye, tal como se observó anteriormente) se alcanza un punto, alrededor de 28 a 30 °C, en el que el aumento de eficiencia por la eliminación de la fotorrespiración en las plantas C_4 compensa con creces este costo energético. Las plantas C_4 crecen más que las plantas C_3 durante el verano, como puede atestiguar cualquier jardinero con experiencia.

En las plantas CAM, la captura del CO_2 y la acción de la rubisco están separadas en el tiempo

Las plantas crasas tales como los cactus y la piña tropical que son originarias de ambientes muy cálidos y muy secos presentan otra variación respecto a la fijación fotosintética del CO_2, que reduce las pérdidas de vapor de agua a través de los poros (estomas) por los que han de entrar el CO_2 y el O_2 en el tejido de la hoja. En lugar de separar la captura inicial del CO_2 y su fijación por la rubisco a través del espacio (tal como hacen las plantas C_4), separan estos procesos en el tiempo. Por la noche, cuando el aire es más fresco y húmedo, los estomas se abren para permitir la entrada de CO_2 que es fijado en



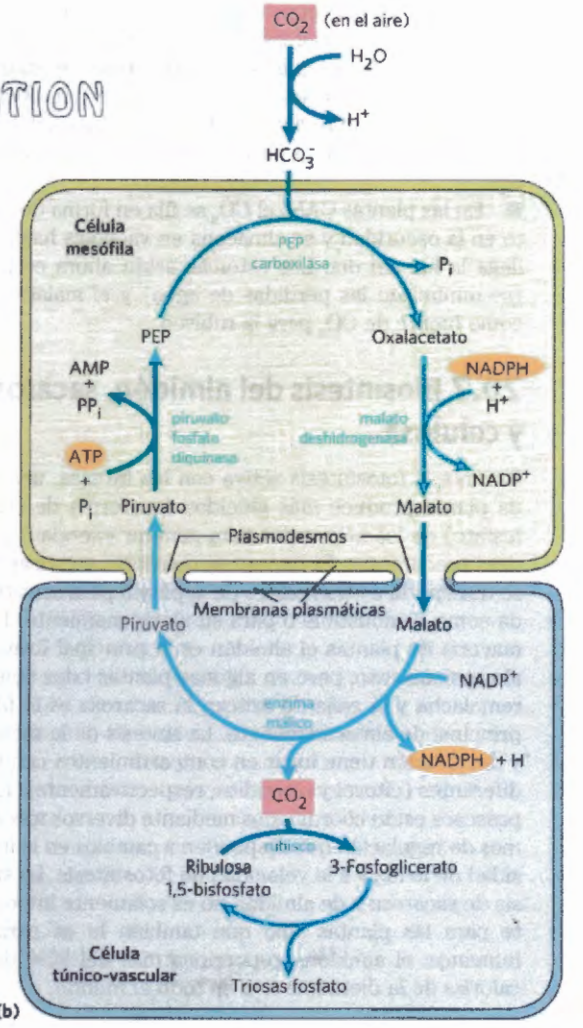


FIGURA 20-50 Asimilación de carbono en las plantas C_4. La ruta C_4, donde intervienen las células mesófilas y las células túnico-vasculares, predomina en plantas de origen tropical. **(a)** Micrografía electrónica que muestra cloroplastos de células mesófilas y túnico-vasculares adyacentes. Las células túnico-vasculares contienen gránulos de almidón. Los plasmodesmos que unen las dos células son evidentes. **(b)** Ruta C_4 de asimilación del CO_2 que transcurre a través de un intermediario de cuatro carbonos. [Fuente: **(a)** Dr. Ray Evert, University of Wisconsin-Madison, Department of Botany.]

forma de oxalacetato por la PEP carboxilasa. El oxalacetato se reduce a malato y se almacena en las vacuolas para proteger a los enzimas citosólicos y de los plastidios del bajo pH producido por la disociación del ácido málico. Durante el día se cierran los estomas impidiendo la pérdida de agua debida a las elevadas temperaturas diurnas, mientras que el CO_2 capturado en el malato durante la noche se libera en forma de CO_2 por el enzima málico ligado a NADP. Este CO_2 es ahora asimilado por acción de la rubisco y los enzimas del ciclo de Calvin. Debido a que este método se descubrió en plantas con floración perenne de la familia *Crasuláceas*, se denomina *m*etabolismo *á*cido *c*rasuláceo (*c*rassulacean *a*cid *m*etabolism) y las plantas se denominan **plantas CAM.**

RESUMEN 20.6 Fotorrespiración y rutas C_4 y CAM

- Cando la rubisco utiliza O_2 en lugar de CO_2 como sustrato, el 2-fosfoglicolato formado se elimina mediante una ruta dependiente de oxígeno. El resultado es un incremento en el consumo de O_2, la fotorrespiración o, de forma más precisa, el ciclo fotosintético oxidativo del carbono o ciclo C_2. El 2-fosfoglicolato se convierte en glioxilato, glicina y finalmente en serina en una ruta en la que intervienen enzimas del estroma del cloroplasto, del peroxisoma y de la mitocondria.
- En las plantas C_4 la ruta de asimilación del carbono minimiza la fotorrespiración: el CO_2 se fija primeramente en las células mesófilas dando un compuesto de cuatro carbonos que pasa a las células túnico-vasculares y libera altas concentraciones de CO_2. Este CO_2 liberado es fijado por la rubisco y el resto de reacciones del ciclo de Calvin se dan de la misma forma que en las plantas C_3.
- En las plantas CAM, el CO_2 se fija en forma de malato en la oscuridad y se almacena en vacuolas hasta que llega la luz del día. Los estomas están ahora cerrados (se minimizan las pérdidas de agua) y el malato sirve como fuente de CO_2 para la rubisco.

20.7 Biosíntesis del almidón, sacarosa y celulosa

Durante la fotosíntesis activa con luz intensa, una hoja de planta produce más glúcidos (en forma de triosas fosfato) de los necesarios para generar energía o sintetizar precursores. El exceso se convierte en sacarosa y se transporta a otras partes de la planta para ser utilizada como combustible o para su almacenamiento. En la mayoría de plantas el almidón es la principal forma de almacenamiento, pero en algunas plantas tales como la remolacha y la caña de azúcar, la sacarosa es la forma principal de almacenamiento. La síntesis de la sacarosa y del almidón tiene lugar en compartimientos celulares diferentes (citosol y plastidios, respectivamente). Estos procesos están coordinados mediante diversos mecanismos de regulación que responden a cambios en la intensidad de la luz y a la velocidad de fotosíntesis. La síntesis de sacarosa y de almidón no es solamente importante para las plantas sino que también lo es para los humanos: el almidón proporciona más del 80% de las calorías de la dieta humana en todo el mundo.

La ADP-glucosa es el sustrato de la síntesis de almidón en los plastidios de las plantas y de la síntesis de glucógeno en las bacterias

El almidón, al igual que el glucógeno, es un polímero de masa molecular elevada formado por D-glucosa en enlace (α1→4). La síntesis de almidón tiene lugar en los cloroplastos para almacenamiento temporal como uno de los productos finales estables de la fotosíntesis, y en los amiloplastos de las partes no fotosintéticas de las plantas: semillas, raíces y tubérculos, para almacenamiento a largo plazo.

El mecanismo de activación de la glucosa en la síntesis de almidón es similar al de la síntesis del glucógeno. Se forma un **nucleótido-azúcar** activado, **ADP-glucosa** en este caso, por condensación de glucosa 1-fosfato con ATP en una reacción prácticamente irreversible debido a la presencia de pirofosfato inorgánico hidrolasa en los plastidios (Fig. 15-31). A continuación la **almidón sintasa** transfiere residuos de glucosa desde la ADP-glucosa a moléculas de almidón pre-existentes. La unidades monoméricas de glucosa se adicionan casi con toda seguridad al extremo no reductor del polímero en crecimiento, al igual que en la síntesis del glucógeno (véase la Fig. 15-32).

La amilosa del almidón no tiene ramificaciones, pero la amilopectina tiene numerosas ramificaciones unidas en enlace (α1→6) (véase la Fig. 7-13). Los cloroplastos contienen un enzima ramificante similar al enzima ramificante del glucógeno (véase la Fig. 15-33) que introduce las ramificaciones (α1→6) de la amilopectina. Considerando la hidrólisis por la pirofosfato inorgánico hidrolasa del PP_i producido durante la síntesis de ADP-glucosa, la reacción global para la formación de almidón a partir de glucosa 1-fosfato es

$$\text{Almidón}_n + \text{glucosa 1-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{almidón}_{n+1} + \text{ADP} + 2P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} = -50 \text{ kJ/mol}$$

La síntesis del almidón está regulada a nivel de la formación de ADP-glucosa tal como se discute más adelante.

Muchos tipos de bacterias almacenan glúcidos en forma de glucógeno (esencialmente almidón muy ramificado), que sintetizan en una reacción análoga a la catalizada por la glucógeno sintasa en animales. Las bacterias, al igual que los plastidios de plantas, utilizan ADP-glucosa como forma activada de la glucosa mientras que las células animales utilizan UDP-glucosa. Una vez más, la similitud entre el metabolismo de plastidios y bacterias está de acuerdo con la hipótesis endosimbiótica del origen de orgánulos (véase la Fig. 1-40).

La UDP-glucosa es el sustrato de la síntesis de sacarosa en el citosol de las células de las hojas

La mayor parte de las triosas fosfato generadas por fijación del CO_2 en las plantas se convierte en sacarosa **(Fig. 20-51)** o almidón. La sacarosa puede haber sido seleccionada durante la evolución como forma de transporte del carbono debido al enlace poco habitual entre el C-1 anomérico de la glucosa y el C-2 anomérico de la fructosa. Este enlace no es hidrolizado por amilasas u otros enzimas que escinden glúcidos comunes, y la inaccesibilidad de los carbonos anoméricos evita que la

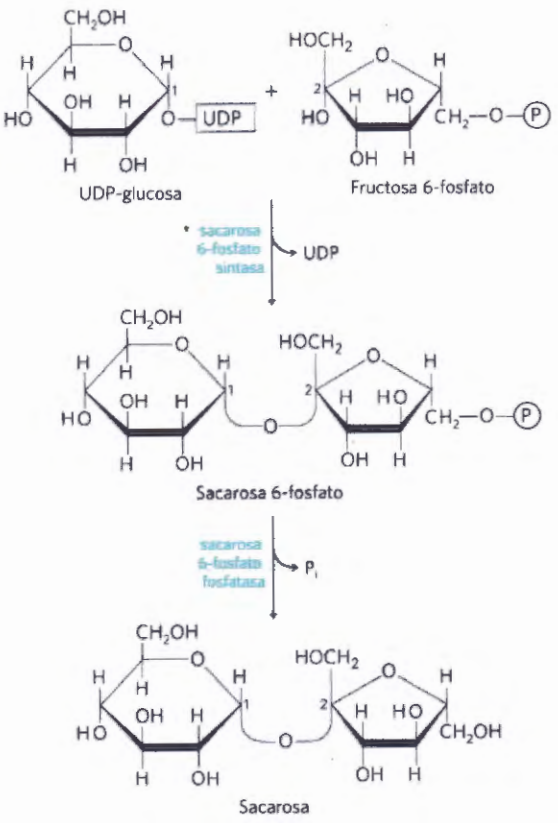


FIGURA 20-51 Síntesis de sacarosa. La sacarosa se sintetiza a partir de UDP-glucosa y fructosa 6-fosfato, que se sintetizan a partir de triosas fosfato en el citosol de la célula vegetal por las rutas mostradas en las Figuras 15-31 y 20-36. La sacarosa 6-fosfato sintasa de la mayor parte de especies vegetales está regulada alostéricamente por glucosa 6-fosfato y P_i.

sacarosa reaccione de forma no enzimática (como sí lo hace la glucosa) con aminoácidos y proteínas.

La sacarosa se sintetiza en el citosol, empezando con la dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato exportados desde el cloroplasto. Después de la condensación de dos triosas fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato (catalizada por la aldolasa), la hidrólisis por la fructosa 1,6-bisfosfatasa forma fructosa 6-fosfato. La **sacarosa 6-fosfato sintasa** cataliza a continuación la reacción de la fructosa 6-fosfato con **UDP-glucosa** para formar **sacarosa 6-fosfato** (Fig. 20-51). Finalmente, la **sacarosa 6-fosfato fosfatasa** elimina el grupo fosfato con lo que la sacarosa está disponible para su exportación a otros tejidos. La reacción catalizada por la sacarosa 6-fosfato sintasa es un proceso de baja energía ($\Delta G'^{\circ}$ = -5,7 kJ/mol) pero la hidrólisis de la sacarosa 6-fosfato a sacarosa es suficientemente exergónica ($\Delta G'^{\circ}$ = -16,5 kJ/mol) para hacer que la síntesis global de la sacarosa sea esencialmente irreversible. Tal como veremos, la síntesis de sacarosa está regulada de forma muy coordinada con la síntesis de almidón.

Una diferencia notable entre las células de plantas y las de animales es la ausencia en el citosol de las células vegetales del enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa, que cataliza la reacción

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -19.2 \text{ kJ/mol}$$

Para muchas reacciones que liberan PP_i la actividad pirofosfato inorgánico hidrolasa hace que el proceso sea energéticamente más favorable y que estas reacciones tengan tendencia a ser irreversibles. En las plantas, este enzima está presente en los plastidios pero no en el citosol. El resultado es que el citosol de las células de las hojas contengan una concentración sustancial de PP_i (~0,3 mM), suficiente para que reacciones tales como la catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa (véase la Fig. 15-31) sea fácilmente reversible. Recuerde del Capítulo 14 que el isozima citosólico de la fosfofructoquinasa en las plantas utiliza PP_i y no ATP, como dador de fosforilo.

La conversión de triosas fosfato en sacarosa y almidón está estrictamente regulada

Las triosas fosfato producidas en el ciclo de Calvin con luz solar intensa pueden ser, como ya se ha dicho, almacenadas temporalmente en el cloroplasto en forma de almidón, o convertidas en sacarosa y exportadas a partes no fotosintéticas de la planta, o ambas cosas. El equilibrio entre estos dos procesos está fuertemente regulado y, además, han de estar coordinados con la velocidad de fijación de carbono. Cinco sextas partes de las triosas fosfato formadas en el ciclo de Calvin deben reciclarse a ribulosa 1,5-bisfosfato (Fig. 20-41); si más de una sexta parte de la triosa fosfato sale del ciclo para formar sacarosa y almidón el ciclo se hará más lento o se detendrá. Por otra parte, una conversión *insuficiente* de triosa fosfato en almidón o sacarosa secuestraría el fosfato, dejando al cloroplasto deficiente en P_i, que también es esencial para el ciclo de Calvin.

La fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y el enzima que invierte efectivamente su acción, la fosfofructoquinasa dependiente de PP_i- (PP-PFK-1), controlan el flujo de triosas fosfato hacia sacarosa. Estos enzimas son, por tanto, puntos críticos en la regulación del destino de las triosas fosfato producidas por la fotosíntesis. Ambos enzimas están regulados por la **fructosa-2,6-bisfosfato (F26BP),** que inhibe la FBPasa-1 y estimula la PP-PFK-1. En las plantas vasculares la concentración de F26BP varía inversamente con la velocidad de la fotosíntesis **(Fig. 20-52)**. La fosfofructoquinasa-2, responsable de la síntesis de F26BP, es inhibida por la dihidroxiacetona fosfato o el 3-fosfoglicerato y estimulada por la fructosa 6-fosfato y el P_i. Durante la fotosíntesis activa, se produce dihidroxiacetona fosfato y se consume P_i, lo que resulta en la inhibición de la PFK-2 y menores concentraciones de F26BP. Esto favorece un mayor flujo de triosa fosfato hacia fructosa 6-fosfato y síntesis de sacarosa. Con este sistema regulador, se da la síntesis de sacarosa cuando el nivel de triosa fosfato producido por el ciclo de Calvin supera las necesidades para mantener la operatividad del ciclo.

La síntesis de sacarosa también está regulada a nivel de la sacarosa 6-fosfato sintasa, que se activa alostéricamente por la glucosa 6-fosfato y es inhibida por el P_i. Este enzima también está regulado por fosforilación y desfosforilación; una proteína quinasa fosforila el enzima en un residuo Ser específico haciéndolo menos activo mientras que una fosfatasa invierte esta inactivación por eliminación del fosfato **(Fig. 20-53)**. Inhibición de la quinasa por la glucosa 6-fosfato y de la fosfatasa por

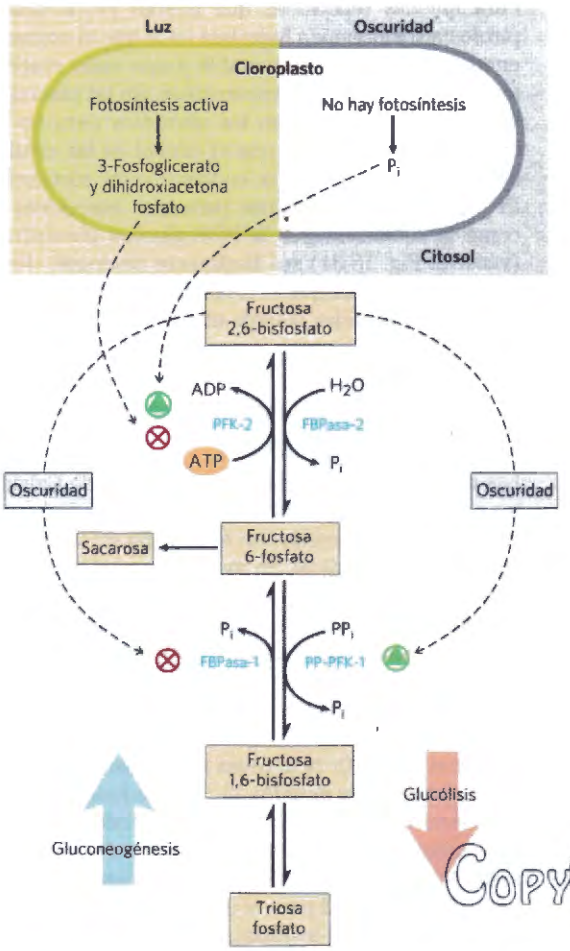


FIGURA 20-52 La fructosa 2,6-bisfosfato como regulador de la síntesis de sacarosa. La concentración del regulador alostérico fructosa 2,6-bisfosfato en las células vegetales está regulada por los productos de la asimilación fotosintética del carbono y por el P_i. La dihidroxiacetona fosfato y el 3-fosfoglicerato producidos por la asimilación del CO_2 inhiben la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), enzima que sintetiza el regulador; el P_i estimula la PFK-2. Por consiguiente, la concentración del regulador es inversamente proporcional a la tasa de fotosíntesis. En la oscuridad, la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato aumenta con lo que estimula el enzima glucolítico fosfofructoquinasa-1 dependiente de PP_i (PP-PFK-1) al tiempo que inhibe el enzima gluconeogénico fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1). Cuando la fotosíntesis es activa (en la luz), la concentración del regulador desciende con lo que se favorece la síntesis de fructosa 6-fosfato y de sacarosa.

P_i refuerzan los efectos de estos dos compuestos sobre la síntesis de sacarosa. Cuando las hexosas fosfato son abundantes, la sacarosa 6-fosfato sintasa es activada por la glucosa 6-fosfato; cuando la concentración de P_i es elevada (al igual que cuando la fotosíntesis es lenta), disminuye la síntesis de sacarosa. Durante la fotosíntesis activa, las triosas fosfato se convierten en fructosa 6-fosfato que se equilibra rápidamente con la glucosa 6-fosfato por la fosfohexosa isomerasa. Debido a que el equilibrio está muy desplazado hacia la glucosa 6-fosfato, así que se acumula la fructosa 6-fosfato aumenta el nivel de glucosa 6-fosfato y se estimula la síntesis de sacarosa.

El enzima regulador clave en la síntesis de almidón es la **ADP-glucosa pirofosforilasa (Fig. 20-54)**, que

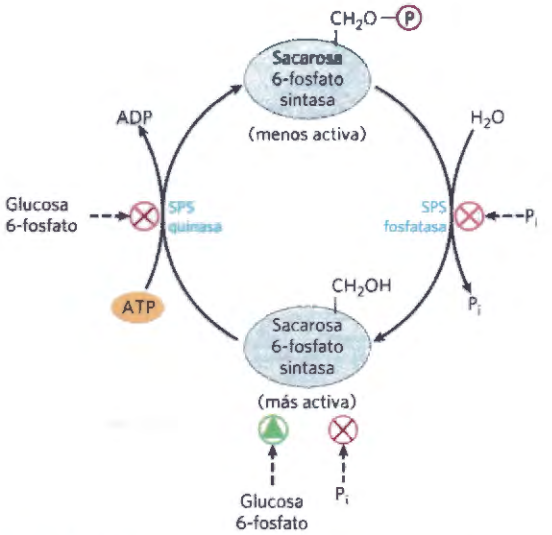


FIGURA 20-53 Regulación de la sacarosa fosfato sintasa por fosforilación. Una proteína quinasa (SPS quinasa) específica de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) fosforila un residuo Ser de la SPS, inactivándola; una fosfatasa específica (SPS fosfatasa) invierte esta inhibición. La quinasa es inhibida alostéricamente por la glucosa 6-fosfato que también activa alostéricamente la SPS. La fosfatasa es inhibida por P_i, que también inhibe directamente la SPS. Así, cuando la concentración de glucosa 6-fosfato es elevada como resultado de una fotosíntesis activa, se activa la SPS produciendo sacarosa fosfato. Una concentración de P_i elevada, lo que sucede cuando la conversión fotosintética de ADP en ATP es lenta, inhibe la síntesis de sacarosa fosfato.

COPY-STATION

es activada por el 3-fosfoglicerato, que se acumula durante la fotosíntesis activa, e inhibida por el P_i, que se acumula cuando la condensación de ADP con P_i impulsada por la luz se vuelve más lenta. Cuando disminuye la velocidad de síntesis de la sacarosa el 3-fosfoglicerato formado por la fijación de CO_2 se acumula, activando este enzima y estimulando la síntesis de almidón.

El ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis producen glucosa en las semillas en germinación

Muchas plantas almacenan lípidos (aceites) y proteínas en sus semillas, que se utilizan como fuente de energía y como precursores biosintéticos durante la germinación, antes de que se haya desarrollado la capacidad fotosintética. Estos componentes almacenados se convierten en glúcidos por la acción combinada de varias rutas. Los aminoácidos glucogénicos (véase la Tabla 14-4) procedentes de la degradación de proteínas almacenadas en las semillas se transaminan y oxidan a succinil-CoA, piruvato, oxalacetato, fumarato y α-cetoglutarato (Capítulo 18), todos ellos buenos materiales de partida para la gluconeogénesis. La gluconeogénesis activa en las semillas en germinación proporciona glucosa para la síntesis de sacarosa, polisacáridos y muchos metabolitos derivados de hexosas. En las plántulas, la sacarosa proporciona gran parte de la energía química necesaria para el crecimiento inicial.

Los triacilgliceroles almacenados en las semillas también proporcionan combustible para las plantas en germinación. Se hidrolizan a ácidos grasos libres y experimentan β-oxidación a acetil-CoA en peroxisomas especializados denominados **glioxisomas** que se desa-

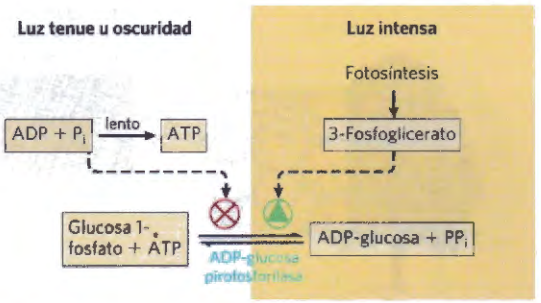


FIGURA 20-54 Regulación de la ADP-glucosa fosforilasa por el 3-fosfoglicerato y el P_i. Este enzima, que produce el precursor para la síntesis del almidón, es limitante de velocidad en la producción de almidón. El enzima es estimulado alostéricamente por el 3-fosfoglicerato (3-PGA) e inhibido por el P_i; en efecto, la razón [3-PGA]/[P_i], que aumenta cuando aumenta la velocidad de fotosíntesis, controla la síntesis de almidón en este paso.

rrollan durante la germinación de la semilla (véase la Fig. 17-14). El acetil-CoA formado a partir de los aceites de las semillas entran en el **ciclo del glioxilato (Fig. 20-55)** que lleva a término la conversión neta de acetato a succinato u otro intermediario de cuatro carbonos del ciclo del ácido cítrico:

$$2\ \text{Acetil-CoA} + \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{succinato} + 2\text{CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

En el ciclo del glioxilato, el acetil-CoA se condensa con oxalacetato formando citrato y el citrato se convierte en isocitrato, exactamente como en el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, el siguiente paso no es la descarboxilación del isocitrato por la isocitrato deshidrogenasa sino la rotura del isocitrato por la **isocitrato liasa**, con formación de succinato y **glioxilato**. A continuación el glioxilato se condensa con una segunda molécula de acetil-CoA para dar malato en una reacción catalizada por la **malato sintasa**. Posteriormente el malato se oxida a oxalacetato, que puede condensarse con otra molécula de acetil-CoA para iniciar otra vuelta del ciclo. El succinato pasa a la matriz mitocondrial en donde se convierte mediante enzimas del ciclo del ácido cítrico en oxalacetato. El oxalacetato se desplaza al citosol en donde puede convertirse en fosfoenolpiruvato por la PEP carboxiquinasa y, seguidamente, a fructosa 6-fosfato, el precursor de la sacarosa, por la gluconeogénesis. Así, secuencias de reacciones llevadas a cabo en tres compartimientos subcelulares (glioxisomas, mitocondrias y citosol) se integran para la producción de fructosa 6-fosfato o sacarosa a partir de lípidos almacenados.

Enzimas comunes en los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato tienen dos isozimas, uno específico de la mitocondria y otro de los glioxisomas. La separación física de los enzimas del ciclo del glioxilato y de la β-oxidación, de los enzimas mitocondriales del ciclo del ácido cítrico, impiden la oxidación posterior del acetil-CoA a CO_2. Cada vuelta del ciclo del glioxilato consume dos moléculas de acetil-CoA y produce una molécula de succinato, la cual queda disponible para fines biosintéti-

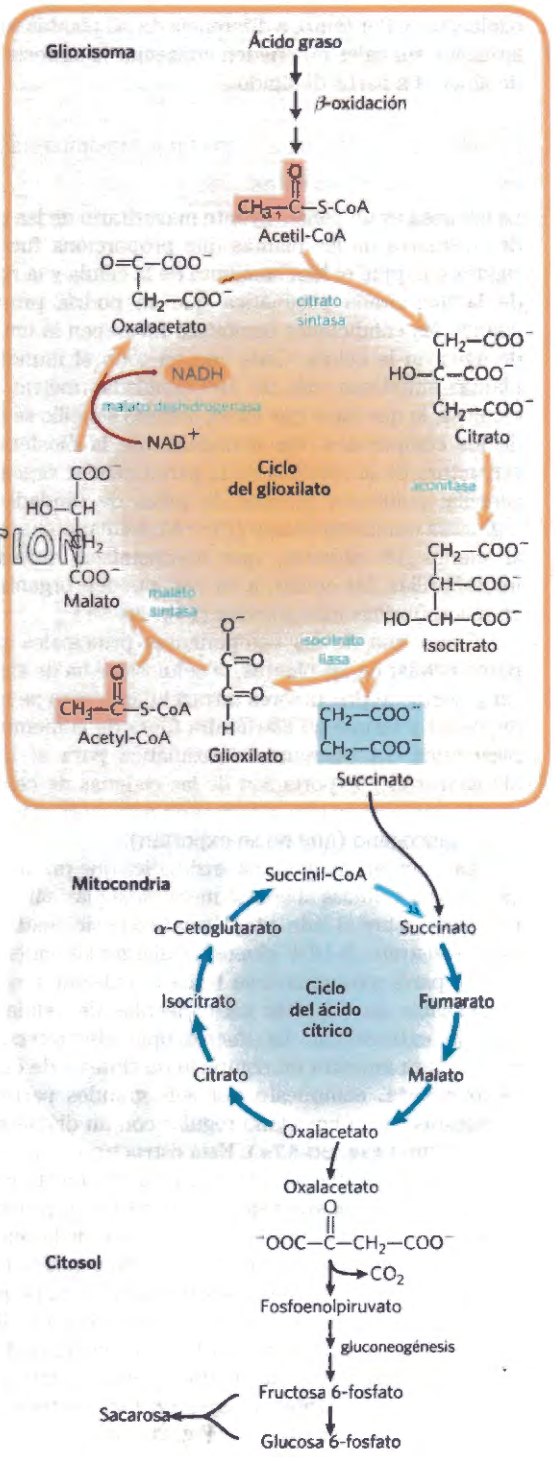


FIGURA 20-55 Conversión de ácidos grasos almacenados a sacarosa en semillas en germinación a través del ciclo del glioxilato. Esta ruta empieza en peroxisomas especializados llamados glioxisomas. La citrato sintasa, aconitasa y malato deshidrogenasa del ciclo del glioxilato son isozimas de los enzimas del ciclo del ácido cítrico; isocitrato liasa y malato sintasa son exclusivos del ciclo del glioxilato. Observe que en el ciclo entran dos grupos acetilo (sombreados en rojo claro) y que cuatro carbonos lo abandonan en forma de succinato (sombreado en azul). El succinato se exporta a la mitocondria, en donde se convierte en oxalacetato por enzimas del ciclo del ácido cítrico. El oxalacetato entra en el citosol y actúa como material de partida para la gluconeogénesis y para la síntesis de sacarosa, la forma de transporte de carbono en los vegetales. El ciclo del glioxilato fue formulado por Hans Kornberg y Neil Madsen en el laboratorio de Hans Krebs.

cos. La hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados también produce glicerol 3-fosfato, que puede entrar en la ruta gluconeogénica, después de oxidarse a dihidroxiacetona fosfato (véase la Fig. 14-17).

Ya observamos en el Capítulo 14 que las células animales pueden llevar a cabo la gluconeogénesis a partir de precursores de tres y cuatro carbonos, pero no a partir de dos carbonos acetílicos del acetil-CoA. Debido a que la reacción de la piruvato deshidrogenasa es efectivamente irreversible (véase la Sección 16.1) y los animales carecen de los enzimas específicos del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa y malato sintasa), no tienen manera de convertir el acetil-CoA en piruvato u oxalacetato. Por tanto, a diferencia de las plantas vasculares, los animales no pueden conseguir la síntesis neta de glucosa a partir de lípidos.

La celulosa se sintetiza por estructuras supramoleculares de la membrana plasmática

La celulosa es un constituyente mayoritario de las paredes celulares de las plantas que proporciona fuerza y rigidez e impide el hinchamiento de la célula y la rotura de la membrana plasmática que se podría producir cuando las condiciones osmóticas favorecen la entrada de agua en la célula. Cada año en todo el mundo las plantas sintetizan más de 10^{11} toneladas métricas de celulosa, lo que hace que este polímero sencillo sea uno de los compuestos más abundante de la biosfera. La estructura de la celulosa de la pared celular vegetal es sencilla: polímeros lineales de miles de unidades de D-glucosa unidas en enlace ($\beta 1 \rightarrow 4$), formando haces de al menos 18 cadenas, que co-cristalizan formando microfibrillas, las cuales, a su vez, pueden organizarse en macrofibrillas más grandes **(Fig. 20-56)**.

Como uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas, la celulosa se ha de sintetizar a partir de precursores intracelulares pero se ha de depositar y formar su estructura fuera de la membrana plasmática. La maquinaria enzimática para el inicio, alargamiento y exportación de las cadenas de celulosa es más complicada que la necesaria para sintetizar almidón o glucógeno (que no se exportan).

La compleja maquinaria enzimática que produce las cadenas de celulosa abarca la membrana plasmática con una parte sobre el lado citoplasmático posicionada para unir el sustrato, la UDP-glucosa, y alargar las cadenas, y la otra parte extendiéndose hacia el exterior y que es responsable de exportar las moléculas de celulosa al espacio extracelular. La microscopia electrónica por criofractura muestra un complejo de síntesis de celulosa, o **roseta,** compuesto por seis grandes partículas dispuestas en un hexágono regular con un diámetro de unos 30 nm **(Fig. 20-57a)**. Esta estructura está formada por varias proteínas, entre ellas la subunidad catalítica de la **celulosa sintasa.** Gran parte de los progresos recientes en el conocimiento de la síntesis de la celulosa provienen de los estudios genéticos y de genética molecular de la planta *Arabidopsis thaliana*; esta pequeña planta con flores es especialmente asequible a la disección genética y su genoma ya ha sido secuenciado. La estructura de la celulosa sintasa vegetal es similar a la de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, determinada por cristalografía de rayos X (Fig. 20-57b).

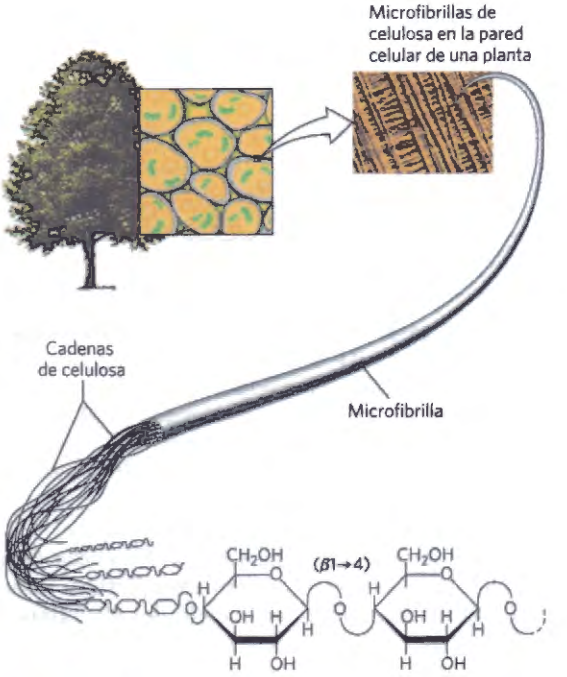


FIGURA 20-56 Estructura de la celulosa. La pared celular de las plantas está formada en parte por moléculas de celulosa dispuestas una al lado de la otra formando ordenamientos paracristalinos: las microfibrillas de celulosa. Varias microfibrillas pueden combinarse formando macrofibrillas de celulosa más grandes. El microscopio electrónico de barrido muestra macrofibrillas de 5 a 12 nm de diámetro, depositada sobre la superficie celular en varias capas que se distinguen por las diferentes orientaciones de las fibrillas. [Fuente: Micrografía electrónica de Biophoto Assocoates/Science Source.]

Copy-Station

En uno de los modelos de síntesis de celulosa, las cadenas de celulosa se inician con la transferencia de un residuo de glucosa desde la UDP-glucosa a una glucosa "cebadora" ya unida a la celulosa sintasa en el lado citoplasmático de la membrana plasmática formando un disacárido. Como la adición de más residuos de glucosa alarga la cadena, se extruye a través de un canal formado por las hélices transmembrana de la celulosa sintasa y, en la superficie exterior de la membrana plasmática, se une a cadenas en crecimiento, formadas por moléculas de celulosa sintasa vecinas, y forman una microfibrilla de celulosa. Los polímeros de más de 6 a 8 unidades de glucosa son insolubles en agua, lo que promueve la cristalización de la microfibrilla. No existe una longitud definida para un polímero de celulosa; la síntesis es muy procesiva y algunos polímeros pueden alcanzar hasta 15.000 unidades de glucosa.

La UDP-glucosa utilizada para la síntesis de celulosa (paso ❶ en la Fig. 20-57) se genera a partir de la sacarosa producida durante la fotosíntesis, en la reacción catalizada por la sacarosa sintasa (nombrada según la reacción inversa):

$$\text{Sacarosa} + \text{UDP} \longrightarrow \text{UDP-glucosa} + \text{fructosa}$$

Una forma de sacarosa sintasa unida a la membrana puede producir una elevada concentración local de UDP-glucosa para la síntesis de celulosa.

Cada una de las seis partículas de la roseta contienen, muy probablemente, tres moléculas de celulosa

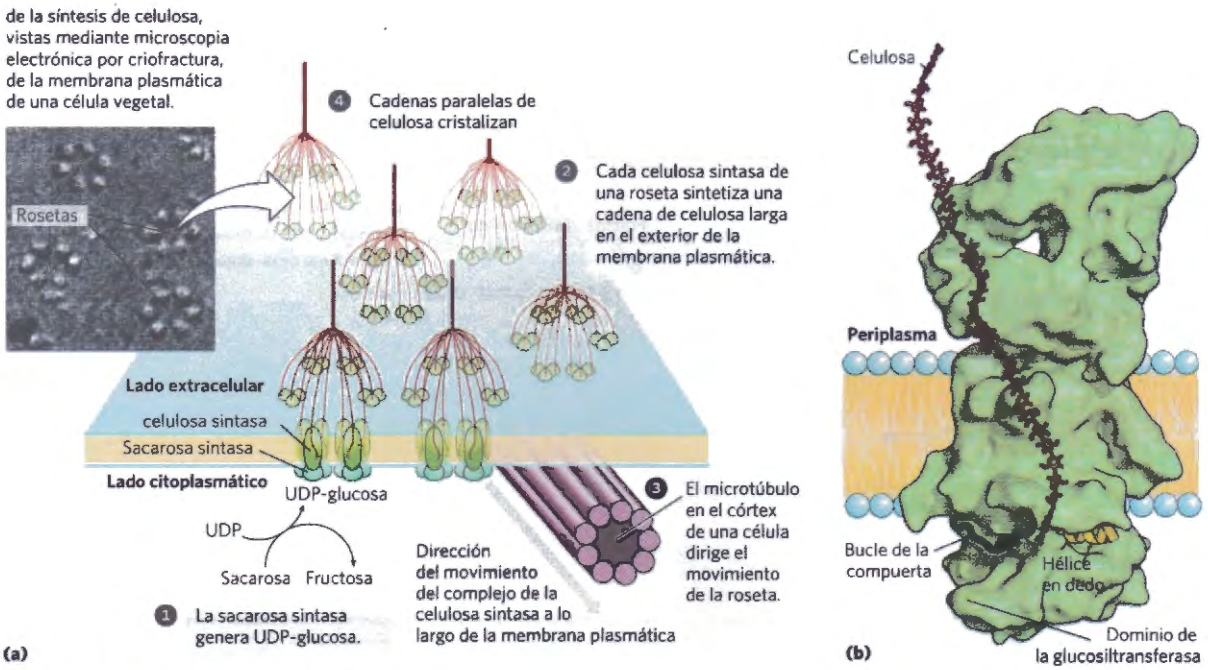


FIGURA 20-57 Un modelo propuesto para la síntesis de celulosa en una planta vascular. (a) Esquema procedente de una combinación de estudios genéticos y bioquímicos en *Arabidopsis thaliana* y otras plantas vasculares. **(b)** Estructura de la celulosa sintasa de *Rhodobacter sphaeroides*. La parte transmembrana de la proteína proporciona un canal a través del cual el polímero de celulosa en crecimiento (rojo) es empujado hacia el periplasma a medida que la cadena crece por la adición de unidades de glucosa sobre la superficie interior de la membrana plasmática. Dos estructuras del enzima se desplazan durante el ciclo catalítico. El bucle de compuerta se desplaza al sitio de unión de sustrato cuando se une la UDP-glucosa, a continuación se desplaza hacia fuera para permitir que salga el UDP. La hélice en forma de dedo toca el residuo de glucosa en el extremo del polímero en crecimiento y, entonces, después de que se haya añadido un nuevo residuo se desplaza de manera que toca esta nueva glucosa terminal. El dominio glucosil transferasa se extiende hacia el citoplasma en donde une el sustrato UDP-glucosa. [Fuentes: **(a)** Micrografía electrónica ©cortesía del Dr. Candace H. Haigler, North Carolina State University y Dr. Mark Grimson, Texas Tech University. **(b)** PDB ID 5EJZ, J. L. W. Morgan et al., *Nature* 531:329, 2016. Se modeló una extensión de la cadena de celulosa.]

Copyrighted

sintasa, que catalizan una cadena sencilla de celulosa cada una de ellas (paso 2). El gran complejo enzimático que cataliza este proceso se desplaza a lo largo de la membrana plasmática, con una direccionalidad que sigue, a menudo, el curso de los microtúbulos en el córtex celular, la capa citoplasmática que se encuentra inmediatamente debajo de la membrana. (paso 3) Cundo estos microtúbulos son perpendiculares al eje de crecimiento de la planta, las microfibrillas de celulosa se disponen de manera similar para promover el alargamiento. Se cree que el desplazamiento de los complejos de celulosa sintasa está impulsado por energía liberada en la reacción de polimerización y no por un motor molecular tal como la quinesina.

La microfibrilla de celulosa fundamental está formada por un complejo de síntesis de la celulosa, de tipo roseta, que se cree que está formado por 18 cadenas que se encuentran una al lado de otra, todas ellas con la misma orientación (paralelas) de extremos no reductores y reductores. Los 18 polímeros separados se unen en la superficie exterior de la célula y cristalizan poco después de polimerizarse (paso 4), justo antes de integrarse en la pared celular.

En la UDP-glucosa, la glucosa está unida al nucleótido a través de una unión α, pero en la celulosa los residuos de glucosa están unidos por enlace ($\beta 1 \rightarrow 4$), por lo que hay una inversión de configuración en el carbono anomérico (C-1) cuando se forma el enlace glucosídico. Por lo general, se supone que las glucosiltransferasas que invierten la configuración usan un mecanismo de desplazamiento sencillo, con ataque nucleofílico por la especie aceptora en el carbono anomérico del azúcar dador (en este caso, la UDP-glucosa).

RESUMEN 20.7 Biosíntesis de almidón, sacarosa y celulosa

- La almidón sintasa de los cloroplastos y amiloplastos cataliza la adición de residuos de glucosa, cedidos por la ADP-glucosa a la cadena en crecimiento del polímero, probablemente al extremo no reductor. Un segundo enzima introduce las ramas en la amilopectina.
- La sacarosa se sintetiza en el citosol en dos pasos a partir de UDP-glucosa y fructosa 1-fosfato.
- La distribución de las triosas fosfato entre la síntesis de sacarosa y la síntesis de almidón está regulada por la fructosa 2,6-bisfosfato (F26BP), un efector alostérico de los enzimas que determinan el nivel de fructosa 6-fosfato. La concentración de F26BP varía inversamente con la velocidad de fotosíntesis y el F26BP inhibe la síntesis de fructosa 6-fosfato, precursor de la sacarosa.
- El ciclo del glioxilato, que tiene lugar en los glioxisomas de semillas en germinación de algunas plantas, utiliza varios enzimas del ciclo del ácido cítrico y dos enzimas adicionales: isocitrato liasa y malato sintasa. Se esquivan los dos pasos de descarboxilación del ciclo del ácido cítrico, lo que permite la formación *neta* de succi-

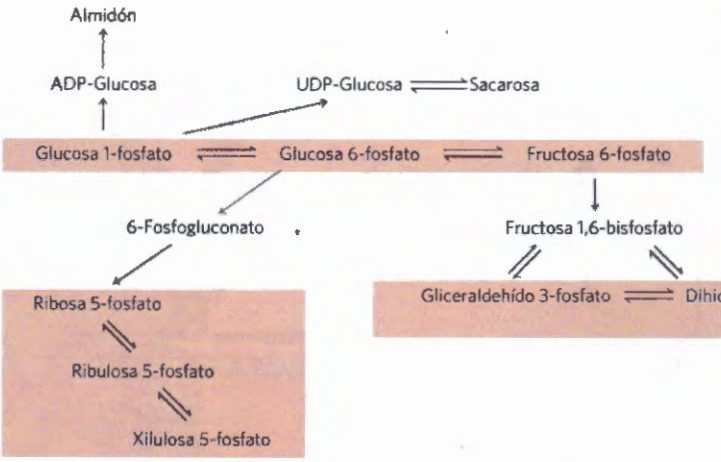


FIGURA 20-58 Fondos (pools) de hexosas fosfato, pentosas fosfato y triosas fosfato. Los compuestos de cada fondo son fácilmente interconvertibles mediante reacciones con variaciones de energía libre estándar pequeñas. Cuando uno de los componentes del fondo está agotado temporalmente, se establece rápidamente un nuevo equilibrio para rellenarlo. El desplazamiento de los azúcares fosfato entre compartimientos intracelulares es limitado; han de existir transportadores específicos en la membrana de un orgánulo.

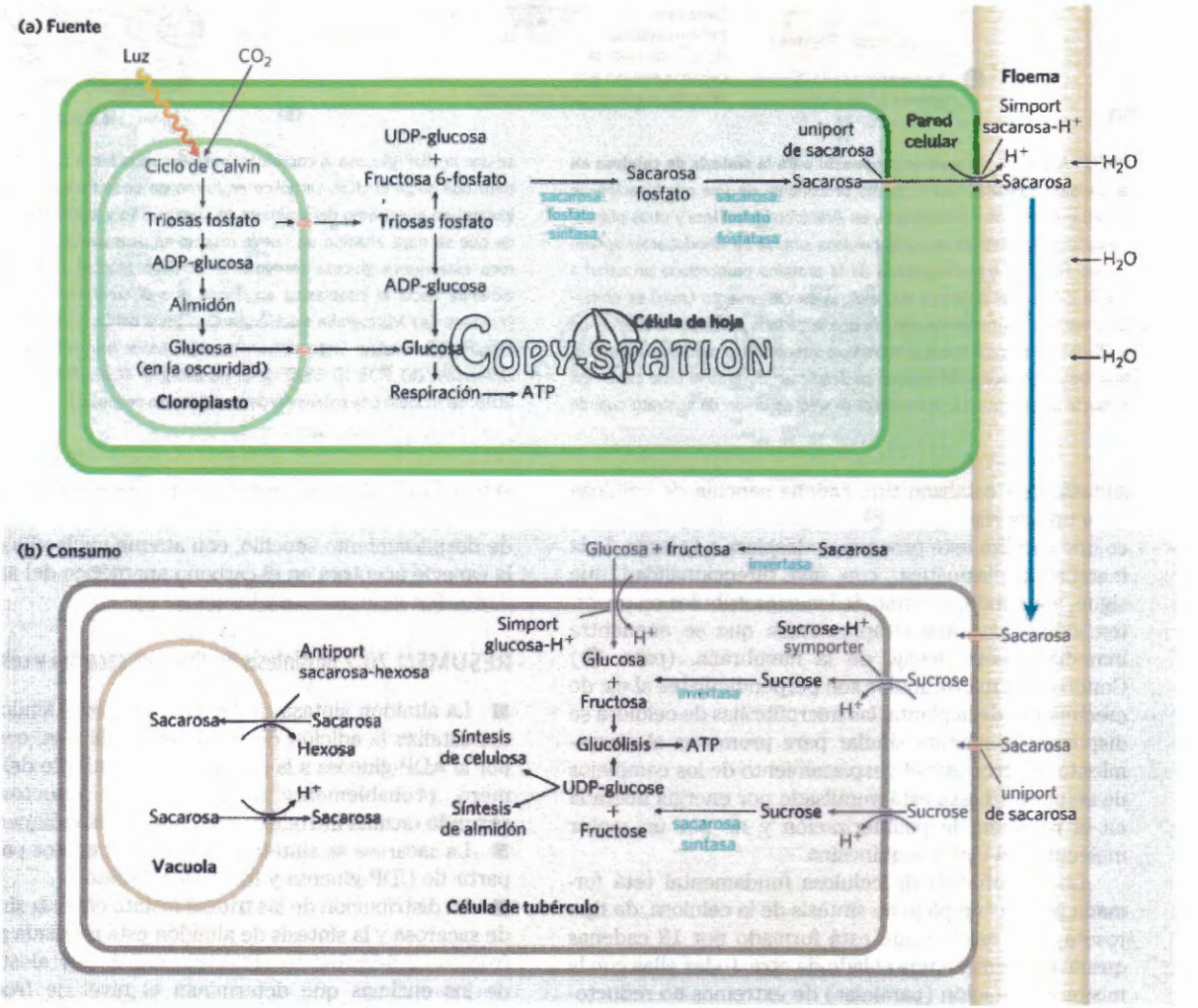


FIGURA 20-59 Desplazamiento de la sacarosa entre tejidos fuente y tejidos de consumo. (a) Con la luz diurna, las hojas fotosintéticas (tejido fuente) fijan CO_2 en forma de triosas fosfato a través del ciclo de Calvin en los cloroplastos. Parte de la triosa fosfato se utiliza en los cloroplastos para sintetizar almidón, el resto se exporta al citosol en donde se pueden convertir, vía gluconeogénesis en fructosa 6-fosfato y glucosa 1-fosfato. La sacarosa, sintetizada a partir de UDP-glucosa y fructosa, se exporta desde las células mesófilas de la hoja al floema de la planta. El alto contenido de sacarosa resultante atrae agua al floema por ósmosis. La presión de turgencia incrementada que resulta de ello empuja la solución en el floema (savia) hacia los tejidos de consumo (bulbos, tubérculos, raíces). **(b)** La sacarosa se desplaza desde el floema hacia los tejidos de consumo en donde se convierte en almidón o en celulosa de la pared celular, o se utiliza como combustible para la glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa para proporcionar ATP a estos tejidos no fotosintéticos. El transporte de azúcar a través de la membrana plasmática y entre compartimientos intracelulares está catalizado por varios cotransportadores paralelos y antiparalelos acoplados a un gradiente de protones.

nato, oxalacetato y otros intermediarios del ciclo a partir del acetil-CoA. El oxalacetato así formado puede utilizarse para sintetizar glucosa (y en último término sacarosa) vía gluconeogénesis.

■ La síntesis de celulosa en las células vegetales tiene lugar en complejos de síntesis de celulosa tipo roseta, en la membrana plasmática, que contiene múltiples copias de celulosa sintasa. Este enzima tiene una actividad glucosil transferasa en su dominio citoplasmático y forma un canal transmembrana a través del cual se expulsa la cadena de celulosa en crecimiento. Las unidades de glucosa se transfieren desde la UDP-glucosa al extremo no reductor de la cadena en crecimiento. Cada roseta produce 18 cadenas separadas de forma simultánea y en paralelo. Las cadenas cristalizan en microfibrillas que se integran en la pared celular. Los microtúbulos corticales orientan las microfibrillas que se están desarrollando.

20.8 Integración del metabolismo glucídico en plantas

En ciertos aspectos el metabolismo glucídico en una célula vegetal típica es más complejo que el de una célula animal típica. La célula vegetal lleva a cabo los mismos procesos que generan energía en las células animales (glucólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa); puede generar hexosas a partir de compuestos de tres o cuatro carbonos por gluconeogénesis; puede oxidar hexosas fosfato a pentosas fosfato con generación de NADPH (ruta oxidativa de las pentosas fosfato) y puede producir un polímero de glucosa con uniones (α1—4) (almidón) y degradarlo para generar hexosas. Pero aparte de estas transformaciones de glúcidos que comparte con las células animales la célula vegetal fotosintética puede fijar CO_2 dando compuestos orgánicos (reacción de la rubisco); utiliza los productos de la fijación para generar triosas, hexosas y pentosas (ciclo de Calvin) y convierte el acetil-CoA generado en la degradación de ácidos grasos en compuestos de cuatro carbonos (ciclo del glioxilato) y los compuestos de cuatro carbonos en hexosas (gluconeogénesis). Estos procesos, específicos de las células vegetales están segregados en diversos compartimientos que no se encuentran en las células animales: el ciclo del glioxilato en los glioxisomas, el ciclo de Calvin en los cloroplastos, la síntesis de almidón en los amiloplastos y el almacenamiento de ácidos orgánicos en las vacuolas. La integración de acontecimientos entre estos compartimientos diversos requiere transportadores específicos en las membranas de cada orgánulo para transportar productos desde un orgánulo a otro o al citosol.

Fondos o reservas ("pools") de intermediarios comunes unen rutas en diferentes orgánulos

Aunque hemos descrito transformaciones metabólicas en células vegetales en términos de rutas individuales, estas rutas están tan interconectadas que, en su lugar, habríamos de considerar fondos o reservas ("pools") de intermediarios metabólicos compartidos entre estas rutas y conectados por reacciones fácilmente reversibles **(Fig. 20-58)**. Uno de estos **fondos de metabolitos** incluye las hexosas fosfato glucosa 1-fosfato, glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato; un segundo fondo incluye los 5-fosfato de las pentosas ribosa, ribulosa y xilulosa; un tercero incluye las triosas fosfato dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Los flujos de metabolitos a través de estos fondos cambian en magnitud y dirección en respuesta a cambios en las circunstancias de la planta, variando también según el tipo de tejido. Los transportadores de la membrana de cada orgánulo transportan compuestos específicos hacia adentro y hacia fuera y la regulación de estos transportadores probablemente influye en el grado con que se mezclan estos fondos.

Durante las horas diurnas, las triosas fosfato producidas en el tejido de las hojas fotosintéticas (tejidos "fuente") por el ciclo de Calvin salen del cloroplasto y van a la reserva o fondo de hexosas fosfato citosólicas, donde se convierten en sacarosa para su transporte a tejidos no fotosintéticos (tejidos "consumo" (*sink*)) **(Fig. 20-59)**. En los tejidos consumo tales como raíces, tubérculos y bulbos, la sacarosa se convierte en almidón para su almacenaje o se utiliza como fuente de energía a través de la glucólisis. En las plantas en crecimiento, las hexosas fosfato también son retiradas del fondo para ser utilizadas en la síntesis de las paredes celulares. Durante la noche, el almidón se metaboliza a través de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa para proporcionar energía tanto a los tejidos fuente como a los tejidos consumo.

RESUMEN 20.8 Integración del metabolismo glucídico en vegetales

■ Las rutas individuales del metabolismo glucídico en las plantas presentan extensos solapamientos; comparten fondos de intermediarios comunes, entre ellos hexosas fosfato, pentosas fosfato y triosas fosfato. Los transportadores de las membranas de los cloroplastos, mitocondrias, y amiloplastos facilitan el movimiento de azúcares fosfato entre orgánulos. La dirección del flujo de metabolitos a través de los fondos, cambia del día a la noche.

■ La sacarosa producida en un tejido fotosintético (fuente) se exporta a los tejidos no fotosintéticos (consumo) tales como raíces y tubérculos a través del floema de la planta.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

fotosíntesis 756
reacciones dependientes de la luz 756
reacciones de asimilación de carbono 756
reacción de fijación de carbono 756
fotofosforilación 756
cloroplasto 756
estroma 756
tilacoide 757
lamela 757
plastidio 757
amiloplasto 757
reacción de Hill 758
fotón 758
cuanto 759
estado excitado 759
estado basal 759
fluorescencia 759
excitón 759
transferencia de excitones 759
clorofilas 759
pigmentos accesorios 759
carotenoides 759
β-caroteno 760
espectro de acción 760
fotosistema 761

centro de reacción fotoquímico 756
complejos de captación de la luz (LHC) 756
feofitina 758
ferredoxina 761
ferredoxina:NAD reductasa 761
fotosistema II (PSII) 762
fotosistema I (PSI) 762
plastocianina 763
fotosíntesis oxigénica 763
esquema Z 763
plastoquinona (PQ) 765
flujo electrónico no cíclico 765
flujo electrónico cíclico 765
fotofosforilación cíclica 766
transición de estado 767
complejo desprendedor de oxígeno 768
complejo de escisión del agua 768
cromatóforo 770
bacteriorrodopsina 773
ciclo de Calvin 776
ribulosa 1,5-bisfosfato 777
3-fosfoglicerato 777
ruta de las pentosas fosfato 777
ciclo reductor de las pentosas fosfato 777
plantas C_3 777
ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) 777
rubisco activasa 777
aldolasa 779
transcetolasa 779
sedoheptulosa 1,7-bisfosfato 779
ribulosa 5-fosfato 779
reacciones de asimilación del carbono 785
tiorredoxina 785
ferredoxina-tiorredoxina reductasa 785
fotorrespiración 786
2-fosfoglicolato 786
ruta del glicolato 787
ciclo fotosintético oxidativo del carbono (ciclo C_2) 788
plantas C_4 789
ruta C_4 789
fosfoenolpiruvato carboxilasa 790
enzima málico 790
piruvato fosfato diquinasa 790
plantas CAM 792
azúcares nucleótido 792
ADP-glucosa 792
almidón sintasa 792
sacarosa 6-fosfato sintasa 793
fructosa 2,6-bisfosfato 793
ADP-glucosa pirofosforilasa 794
glioxisoma 794
ciclo del glioxilato 795
isocitrato liasa 795
glioxilato 795
malato sintasa 795
celulosa sintasa 796

Problemas

1. Eficiencia fotoquímica de luz de diferentes longitudes de onda La velocidad de fotosíntesis en una planta verde, medida según la producción de O_2, es mayor cuando una planta verde se ilumina con luz de 680 nm de longitud de onda que con luz de 700 nm. No obstante, la iluminación mediante una combinación de luz de 680 y 700 nm da una velocidad de fotosíntesis mayor que la de cualquiera de las dos longitudes de onda separadamente. Explíquelo.

2. Balance de la fotosíntesis En 1804 Theodore de Saussure observó que el peso total del oxígeno y de la materia orgánica seca producida por las plantas es mayor que el peso del dióxido de carbono consumido durante la fotosíntesis. ¿De dónde proviene el peso extra?

3. Papel del H_2S en algunas bacterias fotosintéticas Bacterias sulfuradas púrpura iluminadas llevan a cabo la fotosíntesis en presencia de H_2O y $^{14}CO_2$ pero solamente cuando se añade H_2S y en ausencia de O_2. Durante el transcurso de la fotosíntesis, medido por la formación de [^{14}C]glúcido el H_2S se convierte en azufre elemental, pero no se desprende O_2. ¿Cuál es el papel de la conversión del H_2S en azufre? ¿Por qué no se desprende O_2?

4. Aumento del poder reductor del fotosistema I por la absorción de la luz Cuando el fotosistema I absorbe luz roja a 700 nm, el potencial de reducción estándar del P700 cambia desde 0,40 V a alrededor de -1,2 V. ¿Qué proporción de la luz absorbida es retenida en forma de poder reductor?

5. Flujo electrónico a través de los fotosistemas I y II Prediga de qué modo un inhibidor del paso de electrones a través de la feofitina afectaría el flujo electrónico a través de (a) el fotosistema II y (b) el fotosistema I. Explíquelo.

6. Síntesis limitada de ATP en la oscuridad En un experimento de laboratorio se iluminan cloroplastos de espinaca en ausencia de ADP y P_i, a continuación se apaga la luz y se añaden ADP y P_i. Se sintetiza ATP en la oscuridad por un corto período de tiempo. Explique este descubrimiento.

7. Modo de acción del herbicida DCMU Cuando se tratan cloroplastos con el potente herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU o diuron), cesan el desprendimiento de O_2 y la fotofosforilación. Se puede restaurar el desprendimiento de O_2, pero no la fotofosforilación, por adición de un aceptor electrónico externo o reactivo de Hill. ¿De qué modo actúa el DCMU como herbicida? Sugiera una localización para el sitio de inhibición de este herbicida en el esquema que se muestra en la Fig. 20-16. Explíquelo.

8. Efecto de la venturicidina sobre el desprendimiento de oxígeno La venturicidina es un potente inhibidor de la ATP sintasa de los cloroplastos, interaccionando con la parte CF_o del enzima y bloqueando el paso de protones a través del complejo CF_oCF_1. ¿De qué modo se vería afectado por la venturicidina el desprendimiento de oxígeno en una suspensión de cloroplastos bien iluminados? ¿Cambiaría su respuesta si el experimento se realizase en presencia de un agente desacoplante tal como el 2,4-dinitrofenol (DNP)? Explíquelo.

9. Bioenergética de la fotofosforilación Las concentraciones de estado estacionario de ATP, ADP y P_i en los cloroplastos de espinaca aislados bajo iluminación completa a pH 7,0 son 120,0, 6,0 y 700,0 μM, respectivamente.

(a) ¿Cuáles son los requerimientos de energía libre para la síntesis de 1 mol de ATP en estas condiciones?

(b) La energía para la síntesis de ATP es proporcionada por la transferencia de electrones inducida por la luz en los cloroplastos. ¿Cuál es el descenso de voltaje mínimo (durante la transferencia de un par de electrones) para sintetizar ATP en estas condiciones? (Puede que necesite consultar la Ec. 13-7, p. 521).

10. Energía luminosa para una reacción redox Imagine que ha aislado un microorganismo fotosintético nuevo que oxida H_2S y transfiere los electrones al NAD^+. ¿Qué longitud de onda proporcionaría suficiente energía para que el H_2S redujera el NAD^+ en condiciones estándar? Suponga un 100% de eficiencia en el proceso fotoquímico y utilice E'^o = –243 mV para el H_2S y –320 mV para el NAD^+. Véase la Fig. 20-7 para los equivalentes energéticos de las longitudes de onda de la luz.

11. Constante de equilibrio de las reacciones que escinden el agua El coenzima $NADP^+$ es el aceptor electrónico terminal en los cloroplastos según la reacción

$$2H_2O + 2NADP^+ \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

COPY STATION

Utilice la información del Capítulo19 (Tabla 19-2) para calcular la constante de equilibrio a 25 °C de esta reacción. (La relación entre K'_{eq} y $\Delta G°'$ se discute en la p. 498). ¿De qué modo puede superar el cloroplasto este equilibrio desfavorable?

12. Energética de la fototransducción Durante la fotosíntesis se han de absorber ocho fotones (cuatro por cada fotosistema) por cada molécula de O_2 producida:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8\ photons \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Suponiendo que estos fotones tengan una longitud de onda de 700 nm (rojo) y que la absorción y utilización de la energía luminosa sea del 100%, calcule la variación de energía libre del proceso.

13. Transferencia de electrones a un reactivo de Hill Los cloroplastos de espinaca aislados desprenden O_2 cuando se iluminan en presencia de ferricianuro potásico (un reactivo de Hill), según la ecuación

$$2H_2O + 4Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4Fe^{2+}$$

en donde Fe^{3+} representa el ferricianuro y Fe^{2+}, el ferrocianuro. ¿Se produce NADPH en este proceso? Explíquelo.

14. ¿Con qué frecuencia absorbe un fotón una molécula de clorofila? La cantidad de clorofila *a* (M_r 892) en una hoja de espinaca es de aproximadamente 20 $\mu g/cm^2$ de superficie de la hoja. A la luz del mediodía (energía media de 5,4 J/cm^2·min), la hoja absorbe alrededor del 50% de la radiación. ¿Con qué frecuencia una molécula individual de clorofila absorbe un fotón? Si la vida media de una molécula de clorofila excitada in vivo es 1 ns, ¿qué parte de las moléculas de clorofila están excitadas en un momento determinado?

15. Efecto de la luz monocromática sobre el flujo de electrones El grado en el que un transportador electrónico está oxidado o reducido durante la transferencia de electrones fotosintética puede, a veces, observarse directamente con un espectrofotómetro. Cuando se iluminan cloroplastos con luz de 700 nm, el citocromo *f*, la plastocianina y la plastoquinona están oxidados. No obstante, cuando se iluminan los cloroplastos con luz de 680 nm estos transportadores electrónicos están reducidos. Explíquelo.

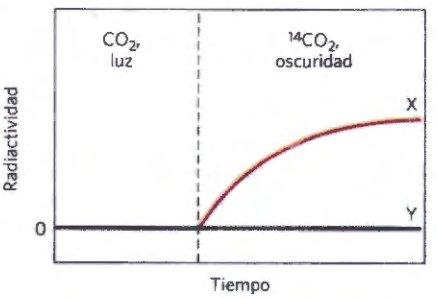
16. Función de la fotofosforilación cíclica Cuando la razón [NADPH]/[$NADP^+$] en los cloroplastos es elevada, la fotofosforilación es predominantemente cíclica (Fig. 20-16). ¿Se desprende O_2 durante la fotofosforilación cíclica? ¿Se produce NADPH? Explíquelo. ¿Cuál es la función principal de la fotofosforilación?

17. Segregación del metabolismo en orgánulos ¿Qué ventajas obtiene la célula vegetal de tener diferentes orgánulos para llevar a cabo diferentes secuencias de reacciones que comparten intermediarios?

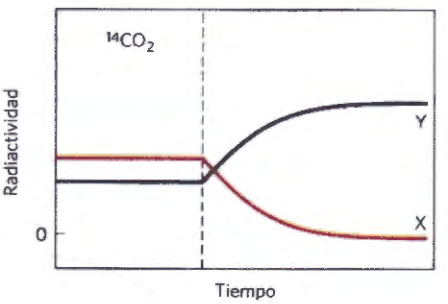
18. Fases de la fotosíntesis Cuando se ilumina una suspensión de algas verdes en ausencia de CO_2 y se incuban después en la oscuridad con $^{14}CO_2$, este $^{14}CO_2$ se convierte en [^{14}C]glucosa durante un tiempo breve. ¿Cuál es el significado de esta observación con respecto al proceso de asimilación de CO_2 y de qué forma se relaciona con las reacciones luminosas de la fotosíntesis? ¿Por qué se detiene la conversión de $^{14}CO_2$ en [^{14}C]glucosa después de un corto tiempo?

19. Identificación de intermediarios clave en la asimilación de CO_2 Calvin y colaboradores utilizaron el alga verde unicelular *Chlorella* para estudiar las reacciones de asimilación de carbono de la fotosíntesis. En sus experimentos incubaron $^{14}CO_2$ con suspensiones de algas iluminadas y siguieron el curso de la aparición de ^{14}C en dos compuestos, X e Y, en dos conjuntos de condiciones. Sugiera las identidades de X e Y basadas en su conocimiento del ciclo de Calvin.

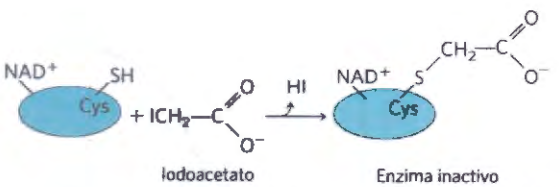
(a) Se hicieron crecer *Chlorella* iluminada con CO_2 sin marcar; a continuación apagaron la luz y se añadió $^{14}CO_2$ (línea vertical a trazos en la gráfica inferior). En estas condiciones X fue el primer compuesto que se marcó con ^{14}C. El compuesto Y no se marcó.



(b) Se hicieron crecer células de *Chlorella* iluminadas en presencia de $^{14}CO_2$. Se continuó la iluminación hasta desaparecer todo el $^{14}CO_2$ (línea vertical a trazos en la gráfica inferior). En estas condiciones el compuesto X se marcó rápidamente pero perdió su radiactividad con el tiempo mientras que el compuesto Y se hizo cada vez más radiactivo.



20. Regulación del ciclo de Calvin El iodoacetato reacciona irreversiblemente con los grupos –SH libres de residuos Cys de las proteínas. Prediga qué enzima(s) del ciclo de Calvin serían inhibidos por el iodoacetato y explique por qué.



21. Comparación de las rutas reductora y oxidativa de las pentosas fosfato La ruta *reductora* de las pentosas fosfato genera una serie de intermediarios idénticos a los de la ruta *oxidativa* de las pentosas fosfato (Capítulo 14). ¿Qué papel juega cada una de las rutas en las células en donde es activa?

22. Fotorrespiración y respiración mitocondrial Compare el ciclo oxidativo fotosintético del carbono (ciclo C_2), también llamado *fotorrespiración* con la *respiración mitocondrial* que impulsa la síntesis de ATP. ¿Por qué a ambos procesos se les denomina respiración? ¿En qué parte de la célula tienen lugar y en qué circunstancias? ¿Cuál es la ruta de los electrones en cada uno de ellos?

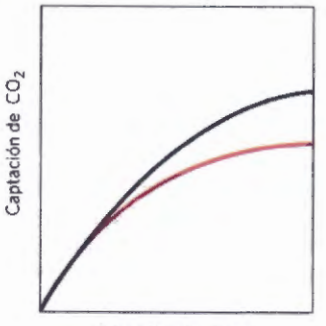
23. Función de la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa ¿Cuál es el efecto sobre la célula y el organismo que podría tener lugar como consecuencia de un defecto de sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa en (a) un hepatocito humano y (b) en la célula de una hoja de una planta verde?

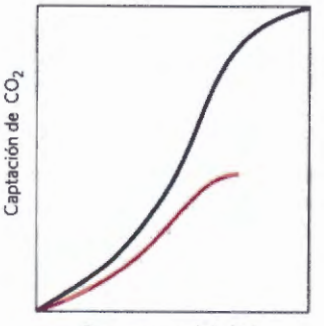
24. Ruta de la asimilación de CO_2 en el maíz Si se ilumina una planta de maíz en presencia de $^{14}CO_2$, después de aproximadamente 1 segundo más del 90% de la radiactividad total incorporada en las hojas se encuentra en los átomos C-4 del malato, aspartato y oxalacetato. Sólo después de 60 segundos aparece el ^{14}C en el átomo C-1 del 3-fosfoglicerato. Explíquelo.

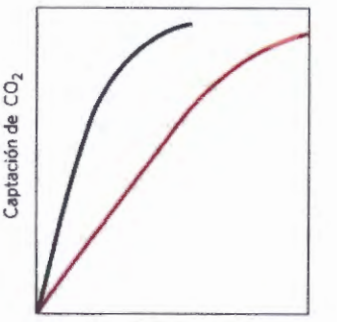
25. Identificación de plantas CAM Si se ponen a su disposición $^{14}CO_2$ y todos los medios que se encuentran en un laboratorio de bioquímica típico, ¿cómo diseñaría un experimento sencillo para determinar si una planta es una planta C_4 típica o una planta CAM?

26. Química del enzima málico: variación sobre un tema El enzima málico, que se encuentra en las células túnico-vasculares de las plantas C_4, lleva a cabo una reacción que tiene su contrapartida en el ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál es la reacción análoga? Explíquelo.

27. Diferencias entre plantas C_3 y C_4 Las plantas del género *Atriplex* incluyen algunas especies C_3 y algunas especies C_4. A partir de los datos de los gráficos siguientes (especie 1, curva negra; especie 2, curva roja) identifique cuál de las dos es una planta C_3 y cuál una C_4. Justifique su respuesta en términos moleculares que expliquen los datos de las tres gráficas.

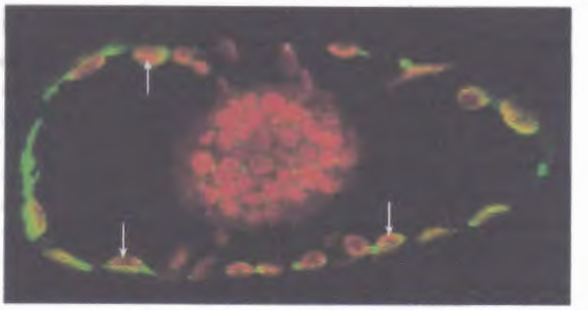






28. Ruta C_4 en una célula individual En las plantas C_4 típicas, la captura inicial del CO_2 tiene lugar en un tipo de célula mientras que las reacciones del ciclo de Calvin tienen lugar en otro (véase la Fig. 20-50). Voznesenskaya y colaboradores han descrito una planta, *Bienertia cycloptera*, que crece en depresiones salinas del semidesierto del Asia Central, que muestra las propiedades bioquímicas de una planta C_4 pero que, a diferencia de las plantas C_4 típicas, no segrega las reacciones de fijación de CO_2 en dos tipos de célula. La PEP carboxilasa y la rubisco se encuentran en la misma célula. Sin embargo, las células tienen dos tipos de cloroplastos localizados de forma diferente. Un tipo con relativamente tilacoides granales (tilacoides), está confinado en la periferia; los cloroplastos más típicos se agrupan en el centro de la célula, separados de los cloroplastos periféricos por grandes vacuolas. Puentes citosólicos finos pasan a través de las vacuolas y conectan el citosol periférico con el central. En la parte inferior se muestra una micrografía de una célula de *B. cycloptera*, con flechas que señalan los cloroplastos periféricos.

Copy-Station



Fuente: Cortesía de Dr. Gerald Edwards, School of Biological Sciences, Washington State University.

En esta planta ¿dónde esperaría encontrar (a) la PEP carboxilasa, (b) la rubisco y (c) los gránulos de almidón? Explique sus respuestas con un modelo para la fijación de CO_2 en estas células C_4. Fuente: Información de E. V. Voznesenskaya et al., Plant J. 31:649, 2002.]

29. ¿Cuál es el coste de almacenar glucosa en forma de almidón? Escriba la secuencia de pasos y la reacción neta requerida para calcular el coste, en número de moléculas de ATP, para convertir una molécula de glucosa 6-fosfato citosólica en almidón y de nuevo en glucosa 6-fosfato. ¿Qué fracción del número máximo de moléculas de ATP disponibles a partir del catabolismo completo de la glucosa 6-fosfato a CO_2 y H_2O representa este coste?

30. Pirofosfato inorgánico hidrolasa El enzima pirofosfato inorgánico hidrolasa contribuye a que muchas reacciones biosintéticas que generan pirofosfato inorgánico sean esen-

cialmente irreversibles en la célula. Al mantener la concentración de PP_i muy baja, el enzima "tira" de estas reacciones en la dirección de formación de PP_i. La síntesis de ADP-glucosa en los cloroplastos es una reacción que discurre en el sentido directo gracias a este mecanismo. Sin embargo, la síntesis de UDP-glucosa en el citosol de las plantas, que produce PP_i, es fácilmente reversible in vivo. ¿Cómo reconcilia estos dos hechos?

31. Regulación de la síntesis de almidón y de sacarosa La síntesis de sacarosa tiene lugar en el citosol y la de almidón en el estroma de los cloroplastos y, no obstante, los dos procesos están finamente equilibrados. ¿Qué factores desplazan las reacciones en favor de (a) la síntesis de almidón y (b) la síntesis de sacarosa?

32. Regulación de la síntesis de sacarosa En la regulación de la síntesis de sacarosa a partir de triosas fosfato producidas en la fotosíntesis, el 3-fosfoglicerato y el P_i juegan papeles clave (véase la Fig. 20-25). Explique por qué las concentraciones de estos dos reguladores reflejan la velocidad de la fotosíntesis.

33. Sacarosa y caries dental La infección más común en la especie humana es la caries dental, que surge de la colonización y destrucción del esmalte dental por diversos microorganismos acidificantes. Estos organismos sintetizan una red de dextranos insolubles en agua, denominada placa dental, sobre la que viven, y que está compuesta por polímeros de glucosa en enlace ($\alpha 1 \rightarrow 6$) con muchos puntos de ramificación ($\alpha 1 \rightarrow 3$). La polimerización del dextrano requiere sacarosa de la dieta y la reacción está catalizada por un enzima bacteriano, la dextrano-sacarosa glucosiltransferasa.

(a) Escriba la reacción global de la polimerización del dextrano.

(b) Además de proporcionar un sustrato para la formación de la placa dental ¿de qué modo la sacarosa de la dieta proporciona a las bacterias bucales una fuente abundante de energía metabólica?

34. División entre los ciclos del ácido cítrico y del glioxilato En un organismo (tal como *E. coli*) que tiene tanto el ciclo del ácido cítrico como el del glioxilato ¿qué es lo que determina que el citrato entre en una u otra vía?

Problema de análisis de datos

35. Fotofosforilación: Descubrimiento, rechazo y redescubrimiento En las décadas de 1930 y 1940, se empezaron a hacer progresos respecto a la comprensión del mecanismo de fotosíntesis. En aquella época, empezaba justamente a conocerse el papel de los "enlaces fosfato ricos en energía" (hoy en día, "ATP") en la glucólisis y en la respiración celular. Había muchas teorías sobre el mecanismo de la fotosíntesis, especialmente sobre el papel de la luz. Este problema se centra en lo que entonces se denominaba "proceso fotoquímico primario", es decir, sobre qué es, exactamente, lo que produce la energía de la luz capturada en la célula fotosintética. Curiosamente, una parte importante del modelo moderno de fotosíntesis fue propuesta muy tempranamente, para ser rechazada, ignorada durante varios años y finalmente ser recuperada y aceptada.

En 1944, Emerson, Stauffer y Umbreit propusieron que "la función de la energía luminosa en la fotosíntesis es la formación de enlaces fosfato de alta 'energía'". En su modelo (de aquí en adelante, el "modelo de Emerson"), la energía libre necesaria para impulsar la fijación *y* reducción del CO_2 procedía de estos "enlaces fosfato ricos en energía" (es decir, ATP) producidos como resultado de la absorción de la luz por una proteína que contenía clorofila.

Este modelo se rechazó explícitamente por Rabinowitch (1945). Después de resumir los hallazgos de Emerson y colaboradores Rabinowitch declaró: "Hasta que no se proporcionen pruebas más sólidas, nos inclinamos a considerar como más convincente un argumento general contra esta hipótesis, que puede deducirse de consideraciones energéticas. La fotosíntesis es eminentemente un problema de *acumulación* de energía. Qué beneficio puede tener, entonces, convertir quanta de luz (incluso los de la luz roja que pueden significar unas 43 kcal por Einstein) en "quanta de fosfato" de sólo 10 kcal por mol? Esto parece ser un camino en la dirección errónea, hacia la *disipación* y no hacia la acumulación de energía" (Vol. I, p. 228). Este argumento, junto con otras pruebas, llevaron al abandono del modelo de Emerson hasta la década de 1950, cuando se encontró que era correcto, si bien en una forma modificada.

Para cada una de las informaciones del artículo de Emerson y colaboradores, presentadas más adelante desde (a) a (d), responda las siguientes preguntas:

1. ¿De qué modo esta información apoya el modelo de Emerson en el que la energía luminosa se utiliza directamente por la clorofila *para formar ATP*, el cual proporciona seguidamente la energía para impulsar la fijación y reducción del CO_2?
2. ¿Cómo explicaría Rabinowith esta información, basándose en su modelo (y la mayoría de los restantes modelos de la época), en el que la energía luminosa se utiliza directamente por la clorofila para *sintetizar compuestos reducidos*? Rabinowitch escribió: "Teóricamente, no existe razón por la que *toda* la energía de los electrones contenida en las moléculas excitadas por la absorción de la luz no debiera estar disponible para oxidación-reducción" (Vol I, p. 152). En este modelo, los compuestos reductores se utilizan entonces para fijar y reducir el CO_2, y la energía para estas reacciones viene de las grandes cantidades de energía libre cedida por las reacciones de reducción.
3. ¿Cómo se explica esta información con nuestros conocimientos modernos sobre la foosíntesis?

(a) La clorofila contiene un ión Mg^{2+}, que se sabe que es un cofactor esencial para muchos enzimas que catalizan reacciones de fosforilación y desfosforilación.

(b) Una "proteína de clorofila" cruda aislada de células fotosintéticas mostró actividad fosforilante.

(c) La actividad fosforilante de la "proteína de clorofila" era inhibida por la luz.

(d) Los niveles de varios compuestos fosforilados diferentes de las células fotosintéticas cambiaron de manera espectacular en respuesta a la exposición a la luz (Emerson y colaboradores no pudieron identificar los compuestos específicos implicados).

Finalmente, se vio que tanto el modelo de Emerson como el de Rabinowitch eran parcialmente correctos y parcialmente incorrectos.

(e) Explique cuál de los dos modelos está más en concordancia con nuestro modelo actual de la fotosíntesis.

En su rechazo del modelo de Emerson, Rabinowitch continuó: "La dificultad de la teoría del almacenamiento de fosfato aparece de manera más clara cuando uno considera el hecho de que, con luz tenue, ocho o diez quanta de luz son suficientes para reducir una molécula de dióxido de carbono. Si cada

COPY STATION

quanto produjese una molécula de fosfato de alta energía, la energía acumulada sería de sólo 80-100 kcal por Einstein, mientras que la fotosíntesis requiere *al menos*, 112 kcal por mol, y probablemente más, debido a pérdidas en las reacciones parciales irreversibles" (Vol. I, p. 228)

(f) ¿De qué modo el valor de Rabinowitch de 8 a 10 fotones por molécula de CO_2 se corresponde con el valor aceptado actualmente? Necesitará consultar el Capítulo 20 para parte de la información aquí requerida.

(g) ¿Cómo refutaría el argumento de Rabinowitch, basándose en nuestro conocimiento actual de la fotosíntesis?

Referencias

Emerson, R.L., J.F. Stauffer, and W.W. Umbreit. 1944. Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*. *Am. J. Botany* 31:107–120.

Rabinowitch, E.I. 1945. *Photosynthesis and Related Processes*, Vol. I. Interscience Publishers, New York.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 21

Biosíntesis de lípidos

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides 805

21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles 820

21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana 824

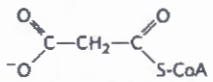
21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: Biosíntesis, regulación y transporte 830

Los lípidos juegan multitud de papeles, algunos de los cuales solo se han reconocido recientemente. Son la principal forma de energía almacenada en la mayoría de organismos y son constituyentes principales de las membranas celulares. Hay lípidos especializados que actúan como pigmentos (retinal, caroteno), cofactores (vitamina K), detergentes (sales biliares), transportadores (dolicoles), hormonas (derivados de la vitamina D, hormonas sexuales), mensajeros extra e intracelulares (icosanoides y derivados del fosfatidilinositol) y anclaje de proteínas de membrana (ácidos grasos unidos covalentemente, grupos prenilo y fosfatidilinositol). La capacidad para la síntesis de los diversos lípidos es, por consiguiente, esencial para todos los organismos. Este capítulo describe las rutas biosintéticas de algunos de los principales lípidos presentes en la mayoría de células, con las que se ilustran las estrategias empleadas en la construcción de estos productos insolubles en agua a partir de precursores hidrosolubles sencillos tales como el acetato. Al igual que sucede con otras rutas biosintéticas estas secuencias de reacción son endergónicas y reductoras. Utilizan ATP como fuente de energía metabólica y un transportador electrónico reducido (normalmente NADPH) como reductor.

Describiremos en primer lugar la biosíntesis de los ácidos grasos, componentes primarios de los triacilgliceroles y los fosfolípidos. A continuación examinaremos la incorporación de los ácidos grasos en los triacilgliceroles y en los tipos más sencillos de fosfolípidos de membrana. Finalmente consideraremos la síntesis del colesterol, componente de algunas membranas y precursor de productos esteroideos tales como los ácidos biliares, las hormonas sexuales y las hormonas de la corteza suprarrenal.

21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides

Cuando se descubrió que la oxidación de los ácidos grasos transcurría mediante la eliminación oxidativa sucesiva de unidades de dos carbonos (acetil-CoA) (véase la Fig. 17-8) los bioquímicos creyeron que la biosíntesis de los ácidos grasos podría tener lugar mediante la simple inversión de los mismos pasos enzimáticos. No obstante, tal como se vería más adelante, la biosíntesis y la degradación de los ácidos grasos transcurren por vías diferentes, están catalizadas por conjuntos de enzimas distintos y tienen lugar en partes diferentes de la célula. Además, en la biosíntesis de los ácidos grasos participa un intermediario de tres carbonos, el **malonil-CoA**, que no aparece en la ruta de degradación de los ácidos grasos.



Malonil-CoA

La ruta de síntesis de los ácidos grasos y su regulación son ahora el principal foco de atención. Nos ocuparemos de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos insaturados y sus derivados icosanoides al final de esta sección.

El malonil-CoA se forma a partir del acetil-CoA y del bicarbonato

La formación del malonil-CoA a partir del acetil-CoA es un proceso irreversible catalizado por la **acetil-CoA carboxilasa**. El enzima bacteriano tiene tres subunidades polipeptídicas diferentes (**Fig. 21-1**); en las células animales las tres actividades son parte de un único polipéptido multifuncional. Las células vegetales contienen ambos tipos de acetil-CoA carboxilasa. En todos los casos el enzima contiene el grupo prostético biotina, unido mediante un enlace covalente tipo amida al grupo ε-amino de un residuo Lys que se encuentra en uno de los tres polipéptidos o dominios de la molécula enzimática. La reacción en dos pasos catalizada por este enzima es muy parecida a otras reacciones de carboxilación dependientes de biotina, tales como las catalizadas por

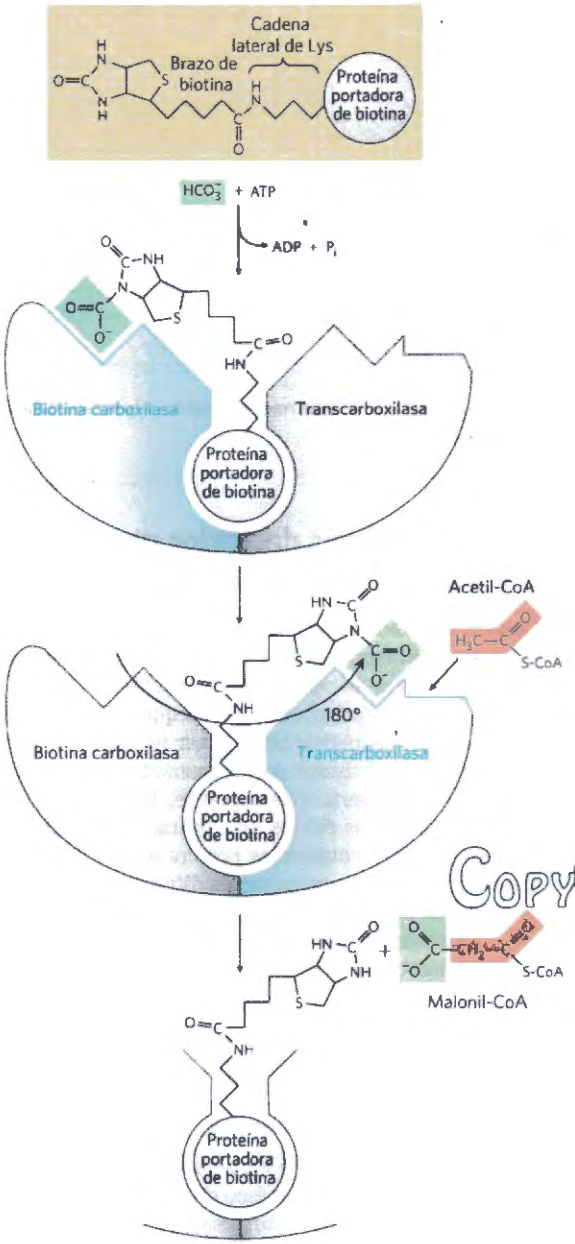


FIGURA 21-1 Reacción de la acetil-CoA carboxilasa. La acetil-CoA carboxilasa tiene tres regiones funcionales: proteína portadora de biotina (gris); biotina carboxilasa, que activa el CO_2 uniéndolo a un nitrógeno del anillo de la biotina en una reacción dependiente de ATP (véase la Fig. 16-17); y transcarboxilasa, que transfiere el CO_2 activado (sombreado en verde) desde la biotina hasta el acetil-CoA, produciendo malonil-CoA. Parte de la proteína transportadora de biotina y el brazo largo y flexible de la biotina rotan para transportar el CO_2 activado desde la región de la biotina carboxilasa hasta el sitio activo de la transcarboxilasa. En cada caso el enzima activo está sombreado en azul.

la piruvato carboxilasa (véase la Fig. 16-17) y la propionil-CoA carboxilasa (véase la Fig. 17-12). Un grupo carboxilo, obtenido del bicarbonato (HCO_3^-), se transfiere en primer lugar a la biotina en una reacción dependiente de ATP. El grupo biotinilo actúa como transportador temporal de CO_2, transfiriéndolo al acetil-CoA en el segundo paso para dar malonil-CoA.

La síntesis de ácidos grasos transcurre mediante una secuencia de reacciones repetidas

En todos los organismos, las cadenas carbonadas largas de los ácidos grasos se forman mediante una secuencia repetida de reacciones con cuatro etapas **(Fig. 21-2)**, catalizadas por un sistema al que se denomina colectivamente **ácido graso sintasa**. Un grupo acilo saturado formado en este conjunto de reacciones de cuatro pasos constituye el sustrato de la siguiente condensación con un grupo malonilo activado. En cada paso a través del ciclo la cadena acilo graso se alarga dos carbonos.

Tanto el cofactor que transporta electrones como los grupos activadores de la secuencia anabólica reductora son diferentes de los que actúan en el proceso oxidativo catabólico. Recuerde que en la β-oxidación, los aceptores electrónicos son NAD^+ y FAD, y que el grupo activador es el grupo tiol (—SH) del coenzima A (véase la Fig. 17-8). En cambio, el agente reductor en la secuencia de síntesis es el NADPH y los grupos activadores son dos grupos —SH diferentes unidos al enzima, tal como se describen más adelante.

Existen dos variantes principales de ácido graso sintasa: la ácido graso sintasa I (FAS I) que se encuentra en los vertebrados y hongos y la ácido graso sintasa II (FAS II), de plantas y bacterias. La FAS I que se encuentra en los vertebrados consta de una única cadena polipeptídica multifuncional (M_r 240.000). La FAS I de mamíferos es el prototipo. Siete sitios activos diferentes para reacciones diferentes se encuentran en dominios separados **(Fig. 21-3a)**. El polipéptido de mamíferos funciona con un homodímero (M_r 480.000). Parece ser que las subunidades funcionan independientemente. Cuando todos los sitios activos de una subunidad se inactivan por mutación, la síntesis de ácidos grasos sólo se reduce moderadamente. En las levaduras y otros hongos se encuentra una FAS I algo diferente formada por dos polipéptidos multifuncionales que forman un complejo con una arquitectura diferente de la de los vertebrados (Fig. 21-3b). Tres de los siete sitios activos necesarios se encuentran en la subunidad α y cuatro en la subunidad β.

Con los sistemas FAS I, la síntesis de ácidos grasos lleva a un solo producto y no se liberan intermediarios. Cuando la cadena alcanza la longitud de 16 carbonos, el producto (palmitato, 16:0, véase la Tabla 10-1) abandona el ciclo. Los carbonos C-16 C-15 del palmitato provienen de los átomos de carbono del metilo y del carboxilo, respectivamente, de un acetil-CoA utilizado directamente para cebar el sistema al principio **(Fig. 21-4)**; el resto de los átomos de carbono de la cadena provienen del acetil-CoA vía malonil-CoA.

La FAS II de plantas y bacterias, es un sistema disociado; cada paso de la síntesis está catalizado por un enzima diferente fácilmente difusible. Los intermediarios también difunden y pueden desviarse a otras rutas (tales como la síntesis de ácido lipoico). A diferencia de FAS I, la FAS II genera diversos productos entre los que se cuentan ácidos grasos saturados de diferentes longitudes, así como ácidos grasos insaturados, ramificados e hidroxilados. En las mitocondrias de vertebrados también se encuentra un sistema FAS II. La siguiente discusión se centra en la FAS I de mamíferos.

Copyright

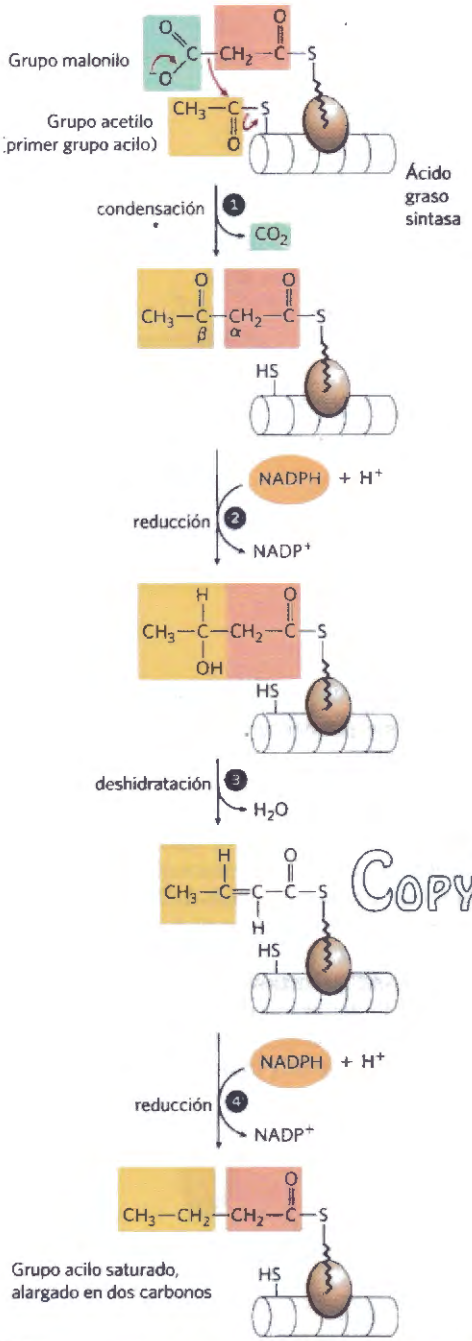
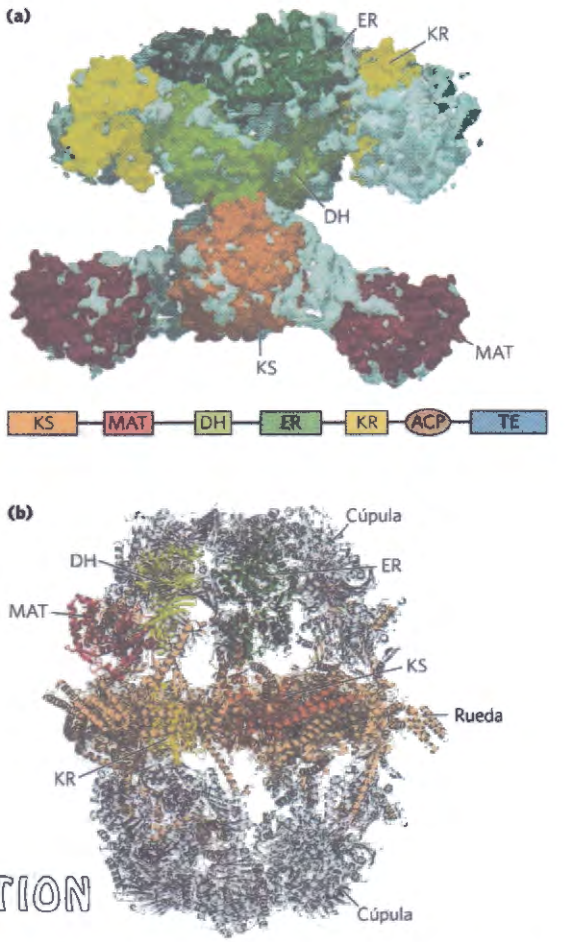


FIGURA 21-2 Adición de dos carbonos a una cadena acilo graso en crecimiento: secuencia de cuatro pasos. Cada grupo malonilo y acetilo (o acilo más largo) es activado por un tioéster que lo une a la ácido graso sintasa, un sistema multienzimático descrito posteriormente en el texto. ❶ La condensación de un grupo acilo activado (un grupo acetilo procedente del acetil-CoA es el primer grupo acilo) y dos carbonos procedentes del malonil-CoA, con la eliminación de CO_2 del grupo malonilo extienden la cadena acílica en dos carbonos. Se presenta el mecanismo de la primera etapa de esta reacción para ilustrar la función de la descarboxilación que facilita la condensación. El producto β-ceto de esta condensación se reduce a continuación en tres pasos casi idénticos a las reacciones de la β oxidación, pero en secuencia inversa: ❷ el grupo β-ceto se reduce a alcohol, ❸ la eliminación de H_2O crea un doble enlace, y ❹ el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilo graso saturado.



COPY-STATION

FIGURA 21-3 Estructura de la ácido graso sintasa de los sistemas tipo I. Se muestran las estructuras de baja resolución de los sistemas enzimáticos (a) de mamífero. **(a)** Todos los sitios activos en el sistema de mamíferos están localizados en diferentes dominios dentro de una única cadena polipeptídica grande. Las diferentes actividades enzimáticas son: β-cetoacil-ACP sintasa (KS), malonil/acetil-CoA-ACP transferasa (MAT), β-hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH), enoil-ACP reductasa (ER) y β-cetoacil-ACP reductasa (KR). ACP es la proteína portadora de acilos. El ordenamiento lineal de los dominios en el polipéptido se muestra debajo de la estructura. El séptimo dominio (TE) es una tioesterasa que libera el producto palmitato del ACP cuando se ha completado la síntesis. Los dominios ACP y TE están desordenados en el cristal y, en consecuencia, no se muestran en la estructura.

(b) En FAS I del hongo *Thermomyces lanuginosus*, los mismos sitios activos se dividen entre dos cadenas polipeptídicas multifuncionales que actúan conjuntamente. En el complejo heterododecamérico se encuentran seis copias de cada polipéptido. En el centro del complejo se encuentra una rueda de seis subunidades α, que incluyen la ACP así como los sitios activos de KS y KR. En la rueda se encuentran tres subunidades en una cara y tres en la otra. A ambos lados de la rueda se encuentran cúpulas formadas por trímeros de las subunidades β, que contienen los sitios activos de ER y DH, así como dos dominios con sitios activos análogos a la MAT del enzima de mamíferos. Los dominios de uno de cada tipo de subunidad están coloreados según los colores del sitio activo del enzima de mamífero en (a). [Fuentes: (a) Dímero procedente de PDB ID 2CF2, T. Maier et al., *Science* 311:1258, 2006. (b) Procedente de PDB ID 2UV9, 2UVA, 2UVB y 2UVC, S. Jenni et al., *Science* 316:254, 2007].

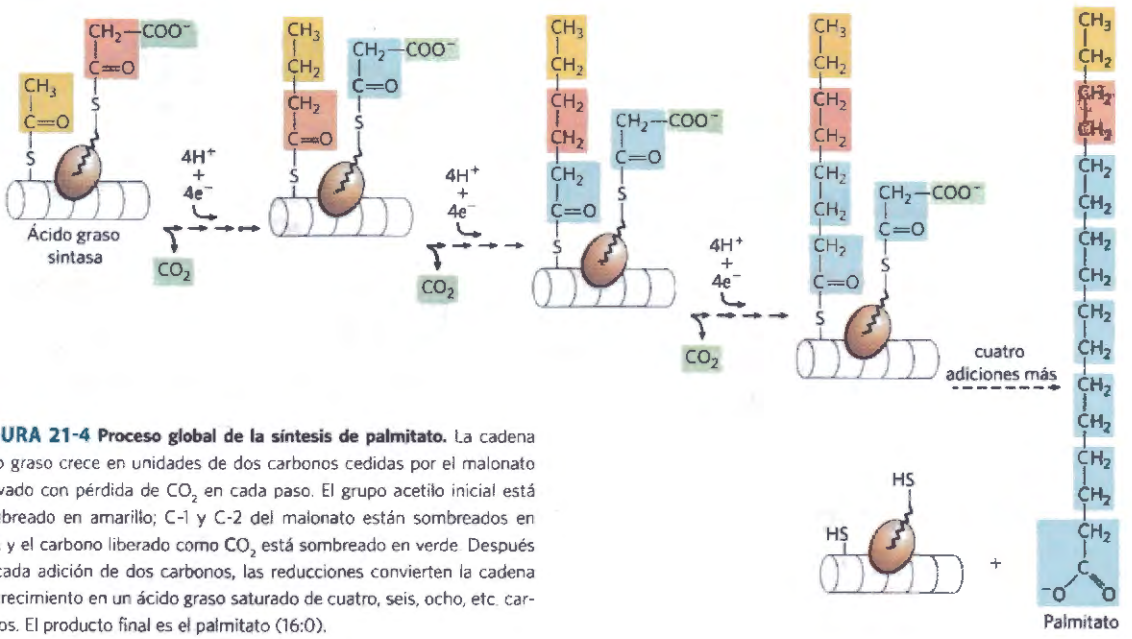


FIGURA 21-4 Proceso global de la síntesis de palmitato. La cadena acilo graso crece en unidades de dos carbonos cedidas por el malonato activado con pérdida de CO_2 en cada paso. El grupo acetilo inicial está sombreado en amarillo; C-1 y C-2 del malonato están sombreados en rosa y el carbono liberado como CO_2 está sombreado en verde. Después de cada adición de dos carbonos, las reducciones convierten la cadena en crecimiento en un ácido graso saturado de cuatro, seis, ocho, etc. carbonos. El producto final es el palmitato (16:0).

El complejo de la ácido graso sintasa de mamíferos tiene múltiples sitios activos

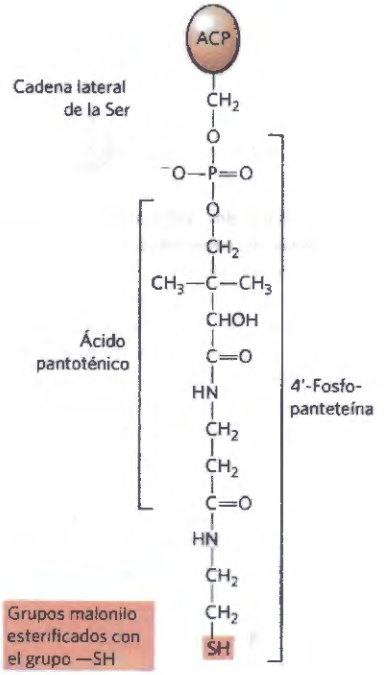
Los diversos dominios de la FAS I de mamíferos funcionan como enzimas distintos pero unidos. El sitio activo de cada enzima se encuentra en un dominio diferente dentro del gran polipéptido. A lo largo del proceso de síntesis de ácidos grasos los intermedios permanecen unidos covalentemente en forma de tioésteres a uno de dos grupos tiol. Un sitio de unión es el grupo —SH de un residuo Cys en una de los dominios de la sintasa (β-cetoacil-ACP sintasa; KS); el otro es el grupo —SH de la proteína portadora de acilos, un dominio separado del mismo polipéptido. La hidrólisis de los tioésteres es muy exergónica; la energía liberada ayuda a que dos pasos (❶ y ❺ de la Fig. 21-6) en la síntesis de ácidos grasos (condensación) sean termodinámicamente favorables.

La **proteína portadora de acilos (ACP)** es la lanzadora que mantiene unido el sistema. La ACP de *E. coli* es una proteína pequeña (M_r 8.860) que contiene el grupo prostético **4'-fosfopanteteína** (**Fig. 21-5**, compárese con el ácido pantoténico y la fracción β-mercaptoetilamina del coenzima A en la Fig. 8-41). Se cree que el grupo prostético 4'-fosfopanteteína de la ACP de *E. coli* sirve de brazo flexible que une la cadena acilo graso creciente a la superficie del complejo de la ácido graso sintasa al tiempo que lleva los intermediarios de la reacción desde un sitio activo del enzima al siguiente. La ACP de mamíferos tiene una función similar y el mismo grupo prostético; sin embargo, tal como hemos visto, está incrustada en forma de dominios dentro de un polipéptido multifuncional mucho mayor.

FIGURA 21-5 Proteína portadora de acilos (ACP). El grupo prostético es la 4'-fosfopanteteína, que está unida covalentemente al grupo hidroxilo de un residuo Ser en la ACP. La fosfopanteteína contiene la vitamina B ácido pantoténico, que también se encuentra en la molécula de coenzima A. Su grupo -SH es el sitio de entrada de grupos malonilo durante la síntesis de ácidos grasos.

La ácido graso sintasa recibe los grupos acetilo y malonilo

Antes de que puedan empezar las reacciones de condensación que construyen la cadena de ácido graso, se han de cargar los dos grupos tiol del complejo enzimático con los grupos acilos correctos (**Fig. 21-6**, parte superior). En primer lugar se transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA a la ACP en una reacción catalizada por el dominio **malonil/acetil-CoA-ACP transferasa** (MAT) del polipéptido multifuncional. A continuación se transfiere el grupo acetilo al grupo —SH de la Cys de la **β-cetoacil-ACP sintasa** (KS). La segunda reacción, transferencia del grupo malonilo desde el malonil-CoA al grupo —SH de la ACP, está también catalizada por la malonil/acetil-CoA-ACP transferasa. En el complejo de



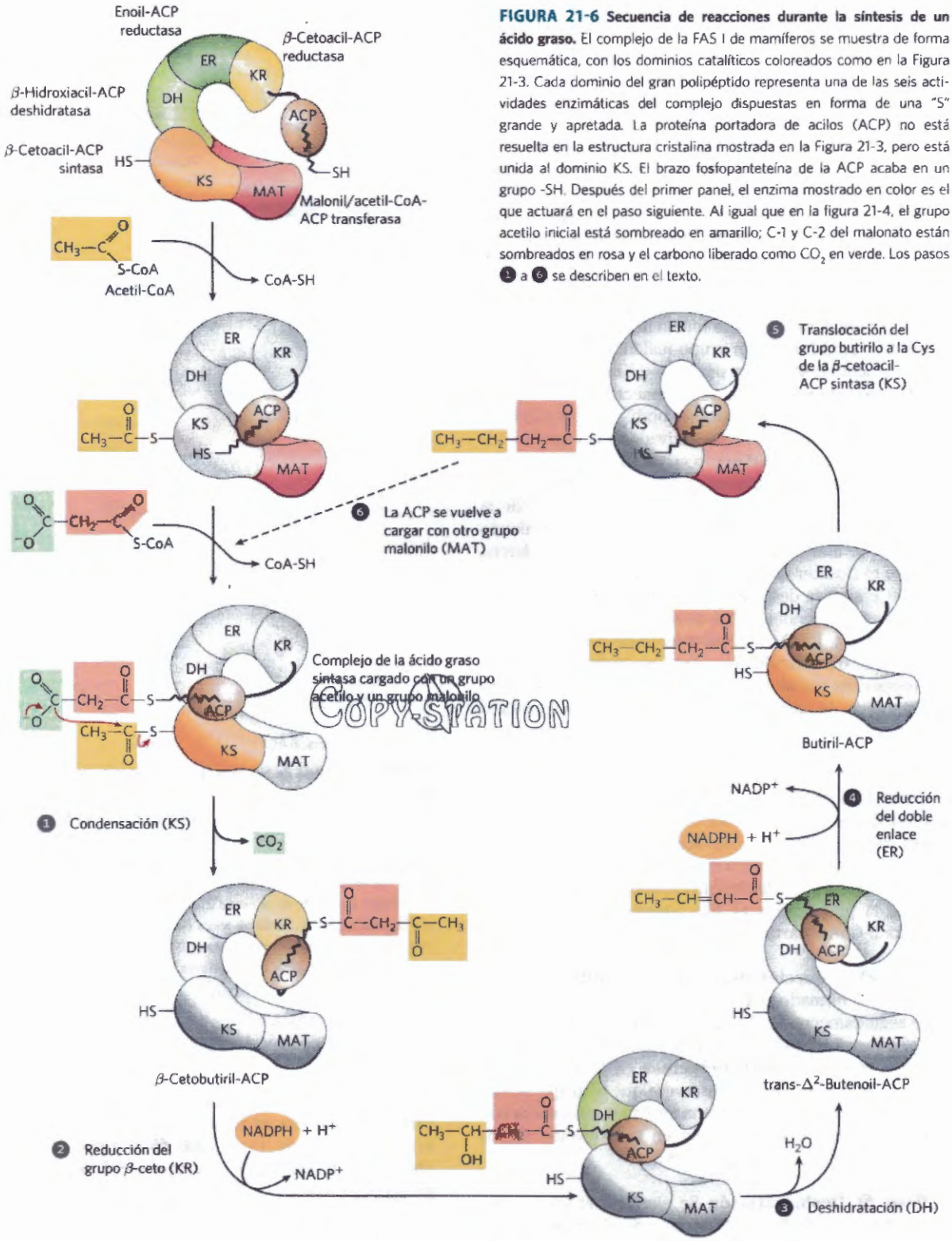


FIGURA 21-6 Secuencia de reacciones durante la síntesis de un ácido graso. El complejo de la FAS I de mamíferos se muestra de forma esquemática, con los dominios catalíticos coloreados como en la Figura 21-3. Cada dominio del gran polipéptido representa una de las seis actividades enzimáticas del complejo dispuestas en forma de una "S" grande y apretada. La proteína portadora de acilos (ACP) no está resuelta en la estructura cristalina mostrada en la Figura 21-3, pero está unida al dominio KS. El brazo fosfopanteteína de la ACP acaba en un grupo -SH. Después del primer panel, el enzima mostrado en color es el que actuará en el paso siguiente. Al igual que en la figura 21-4, el grupo acetilo inicial está sombreado en amarillo; C-1 y C-2 del malonato están sombreados en rosa y el carbono liberado como CO_2 en verde. Los pasos ❶ a ❻ se describen en el texto.

la sintasa cargada, los grupos acetilo y malonilo están activados para el proceso de alargamiento de la cadena. Los cuatro primeros pasos de este proceso los consideramos ahora en cierto detalle; todos los números de las etapas se refieren a la Figura 21-6.

Paso ❶ Condensación La primera reacción en la formación de una cadena de ácido graso es una condensación de Claisen formal en la que intervienen los grupos acetilo y malonilo activados para formar **acetoacetil-ACP**, un grupo acetoacetilo unido a la ACP a través del grupo —SH de la fosfopanteteína; simultáneamente,

se produce una molécula de CO_2. En esta reacción catalizada por la β-cetoacil-ACP sintasa, se transfiere el grupo acetilo desde el grupo —SH de la Cys del enzima al grupo malonilo que se encuentra unido al —SH de ACP, convirtiéndose en la unidad de dos carbonos metilo terminal del nuevo grupo acetoacetilo.

El átomo de carbono del CO_2 formado en esta reacción es el mismo átomo de carbono que se introdujo originalmente en el malonil-CoA a partir del HCO_3^- mediante la reacción de la acetil-CoA carboxilasa (Fig. 21-1). Así, el CO_2 sólo se encuentra transitoriamente en enlace covalente durante la biosíntesis de ácidos grasos; se elimina a medida que se inserta cada unidad de dos carbonos.

¿Por qué las células se toman la molestia de adicionar CO_2 para formar un grupo malonilo a partir de un grupo acetilo, sólo para perderlo de nuevo durante la formación de acetoacetato? La reacción de condensación es termodinámicamente favorable gracias a la utilización de grupos malonilo activados en lugar de los grupos acetilo. El carbono metilénico (C-2) del grupo malonilo, situado entre los carbonos carbonílico y carboxílico es un nucleófilo muy bueno. En el paso de la condensación, la descarboxilación del grupo malonilo facilita el ataque nucleofílico del carbono metilénico sobre el tioéster que une el grupo acetilo a la β-cetoacil-ACP sintasa desplazando el grupo —SH del enzima (Ésta es una condensación de ésteres de Claisen típica; véase la Fig. 13-4). El acoplamiento de la condensación a la descarboxilación del grupo malonilo hace que el proceso sea globalmente muy exergónico. Una secuencia similar de carboxilación-descarboxilación facilita la formación de fosfoenolpiruvato a partir del piruvato en la gluconeogénesis (véase la Fig. 14-18).

Mediante la utilización de grupos malonilo activados en la síntesis de ácidos grasos y de acetato activado en su degradación, la célula consigue que ambos procesos sean favorables energéticamente aunque uno sea, efectivamente, el inverso del otro. La energía extra requerida para que la síntesis de ácidos grasos sea favorable la proporciona el ATP utilizado para sintetizar malonil-CoA a partir de acetil-CoA y HCO_3^- (Fig. 21-1).

Paso ❷ Reducción del grupo carbonilo El acetoacetil-ACP formado en la etapa de condensación se reduce seguidamente en el grupo carbonilo en C-3 formando D-β-hidroxibutiril-ACP. Esta reacción está catalizada por la **β-cetoacil-ACP reductasa** (KR), y el NADPH es el dador electrónico. Obsérvese que el grupo D-β-hidroxibutirilo no tiene la misma forma esteroisómera que el intermedio L-β-hidroxiacilo en la oxidación de los ácidos grasos (véase la Fig. 17-8).

Paso ❸ Deshidratación Se eliminan ahora los elementos del agua de C-2 y C-3 del D-β-hidroxibutiril-ACP y se forma un doble enlace en el producto ***trans*-Δ²-butenil-ACP**. El enzima que cataliza esta deshidratación es la **β-hidroxiacil-ACP deshidratasa** (DH).

Paso ❹ Reducción del doble enlace Finalmente, el doble enlace del *trans*-Δ²-butenil-ACP se reduce (satura) formando **butiril-ACP** por acción de la **enoil-ACP reductasa** (ER); de nuevo el dador electrónico es el NADPH.

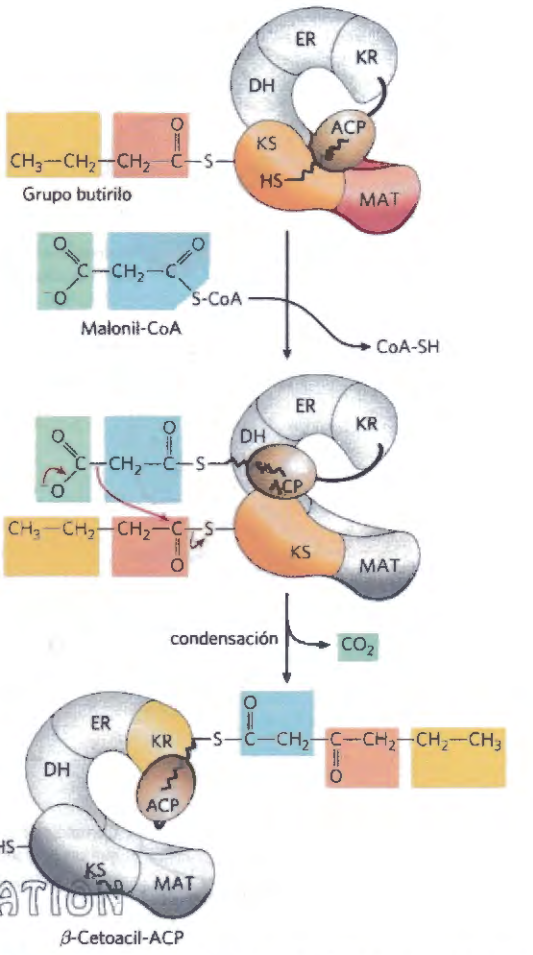


FIGURA 21-7 Inicio de la segunda vuelta del ciclo de la síntesis de ácidos grasos. El grupo butirilo se encuentra sobre el grupo Cys-SH. El grupo malonilo entrante se une primero al grupo -SH de la fosfopanteteína. A continuación, en el paso de condensación, el grupo butirilo completo unido al grupo -SH de la Cys es intercambiado por el grupo carboxilo del residuo malonilo, que se pierde como CO_2 (verde). Este paso es análogo al paso ❶ de la Figura 21-6. El producto, un grupo β-cetoacilo de seis carbonos, contiene ahora cuatro carbonos procedentes del malonil-CoA y dos procedentes del acetil-CoA que comenzó la reacción. El grupo β-cetoacilo pasa ahora a través de los pasos ❷ a ❹, como en la Figura 21-6.

Las reacciones de la ácido graso sintasa se repiten hasta formar palmitato

La producción del acilo graso saturado-ACP de cuatro carbonos completa un paso a través del complejo de la ácido graso sintasa. En el paso ❺ el grupo butirilo es ahora transferido desde el grupo —SH de la ACP al grupo —SH de la Cys de la β-cetoacil-ACP sintasa el cual era portador, inicialmente, del grupo acetilo (Fig. 21-6). Para empezar el siguiente ciclo de cuatro reacciones que alarga la cadena en dos carbonos más (paso ❻), se une otro grupo malonilo al grupo —SH de la fosfopanteteína de la ACP ahora desocupado **(Fig. 21-7)**. La condensación tiene lugar cuando el grupo butirilo, que actúa exactamente igual que el grupo acetilo en el primer ciclo, se une a dos carbonos del grupo malonil-ACP con la pérdida concomitante de CO_2. El producto de esta condensación es un grupo acilo de seis

carbonos, unido covalentemente al grupo —SH de la fosfopanteteína. Su grupo β-ceto se reduce en las tres etapas siguientes del ciclo de la sintasa que produce el grupo acilo saturado, exactamente igual que en la primera vuelta de reacciones, pero en este caso se forma un producto de seis carbonos.

Siete ciclos de condensación y reducción producen el grupo saturado palmitilo de 16 carbonos, aún unido a la ACP. Por razones no bien conocidas, el alargamiento de la cadena por el complejo de la sintasa se detiene generalmente en este punto, y libera palmitato libre de la molécula de ACP por acción de una actividad hidrolítica (tioesterasa; TE) en la proteína multifuncional.

La reacción global para la síntesis de palmitato a partir de acetil-CoA se puede separar en dos partes. Primero la formación de siete moléculas de malonil-CoA:

$$7\ \text{Acetil-CoA} + 7CO_2 + 7\text{ATP} \longrightarrow 7\ \text{malonil-CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i \quad (21\text{-}1)$$

a continuación siete ciclos de condensación y reducción:

$$\text{Acetil-CoA} + 7\ \text{malonil-CoA} + 14\text{NADPH} + 14\ H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 7CO_2 + 8\text{CoA} + 14\text{NADP}^+ + 6H_2O \quad (21\text{-}2)$$

Observe que sólo se producen seis moléculas netas de agua ya que una se utiliza para hidrolizar el enlace tioéster del palmitato con el enzima. El proceso global (suma de las ecuaciones 21-1 y 21-2) es

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 14\ H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 8\text{CoA} + 7\text{ADP} + 7\text{Pi} + 14\text{NADP}^+ + 6H_2O \quad (21\text{-}3)$$

La biosínteis de ácidos grasos tales como el palmitato requiere, por tanto, acetil-CoA y el aporte de energía química en dos formas: el potencial de transferencia de grupo del ATP y el poder reductor del NADPH. Se requiere el ATP para unir CO_2 al acetil-CoA para generar malonil-CoA: el NADPH se requiere para reducir el grupo β-ceto y los dobles enlaces.

En los eucariotas no fotosintéticos existe un coste adicional en la síntesis de ácidos grasos debido a que el acetil-CoA se genera en la mitocondria y se ha de transportar al citosol. Tal como veremos esta etapa adicional consume dos ATP por molécula de acetil-CoA transportado, lo que aumenta el coste energético de la síntesis de ácidos grasos a tres ATP por unidad de dos carbonos.

La síntesis de ácidos grasos es un proceso citosólico de muchos organismos pero en las plantas tiene lugar en los cloroplastos

En la mayoría de eucariotas superiores el complejo de la ácido graso sintasa se encuentra exclusivamente en el citosol **(Fig. 21-8)**, al igual que los enzimas biosintéticos de los nucleótidos, aminoácidos y glucosa. Esta localización separa los procesos sintéticos de las reacciones degradativas, muchas de las cuales tienen lugar en la matriz mitocondrial. Existe una separación similar entre los cofactores transportadores de electrones para el anabolismo (generalmente un proceso reductor) y para el catabolismo (generalmente oxidativo).

Normalmente, el NADPH es el transportador de electrones para las reacciones anabólicas, mientras que el NAD^+ actúa en las reacciones catabólicas. En los hepatocitos, la razón [NADPH]/[$NADP^+$] es muy elevada (~76) en el citosol, lo que confiere un ambiente fuertemente reductor para la síntesis reductora de ácidos grasos y otras biomoléculas. Debido a que la razón citosólica [NADH]/[NAD^+] es mucho menor (alrededor de sólo 8×10^{-4}) el catabolismo oxidativo de la glucosa dependiente de NAD^+ puede transcurrir en el mismo compartimiento y al mismo tiempo que la síntesis de ácidos grasos. La razón [NADH]/[NAD^+] dentro de la mitocondria es mucho más elevada que en el citosol

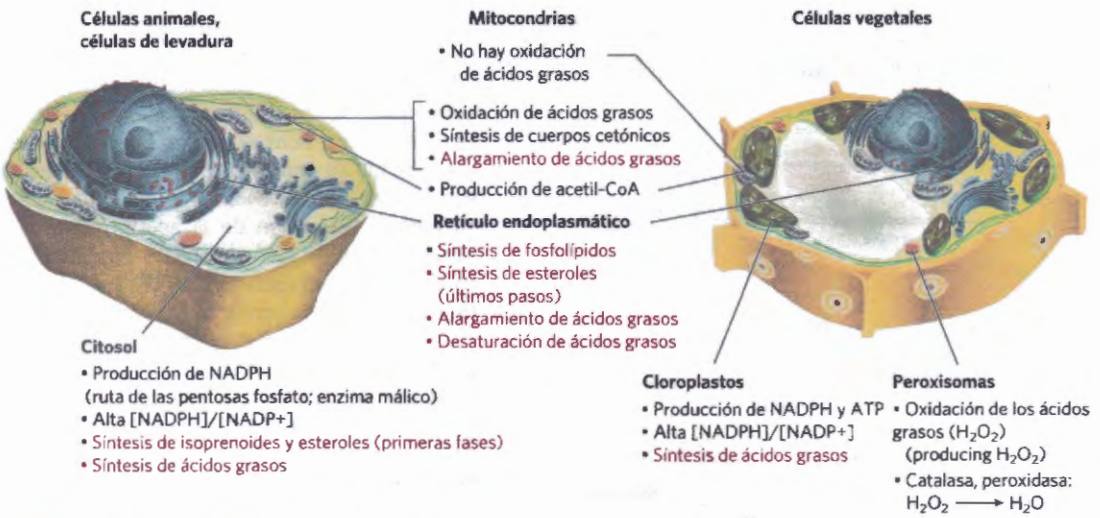


FIGURA 21-8 Localización subcelular del metabolismo lipídico. Las levaduras y las células de animales vertebrados difieren de las células de plantas superiores en la compartimentación del metabolismo lipídico. La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el compartimiento en el que se puede obtener NADPH para la síntesis reductora (es decir, donde la razón [NADPH]/[$NADP^+$] es alta); esto es el citosol en animales y levaduras y el cloroplasto en las plantas. En este capítulo se discuten los procesos señalados en rojo.

debido al flujo de electrones hacia el NAD^+ procedentes de la oxidación de los ácidos grasos, aminoácidos, piruvato y acetil-CoA. Esta elevada razón [NADH]/[NAD^+] mitocondrial favorece la reducción del oxígeno vía cadena respiratoria.

En los hepatocitos y adipocitos el NADPH citosólico está generado principalmente por la vía de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14-22) y por el **enzima málico (Fig. 21-9a)**. El enzima málico ligado al NADP que opera en la ruta de asimilación de carbono de las plantas C_4 (véase la Fig. 20-50) no está funcionalmente relacionado. El piruvato producido en la reacción mostrada en la Fig. 21-9a vuelve a entrar en la mitocondria. En hepatocitos y en la glándula mamaria de animales en período de lactancia el NADPH requerido para la biosíntesis de ácidos grasos es suministrado principalmente por la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 21-9b).

En las células fotosintéticas de las plantas, la síntesis de ácidos grasos no tiene lugar en el citosol, sino en el estroma de los cloroplastos (Fig. 21-8). Esta localización tiene sentido ya que el NADPH es producido en los cloroplastos por las reacciones luminosas de la fotosíntesis:

$$H_2O + NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} \tfrac{1}{2}O_2 + NADPH + H^+$$

El acetato sale de la mitocondria en forma de citrato

En los eucariotas no fotosintéticos casi todo el acetil-CoA utilizado en la síntesis de ácidos grasos se forma en la mitocondria a partir de la oxidación del piruvato y el catabolismo de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. El acetil-CoA que se produce en la oxidación de los ácidos grasos no representa una fuente significativa de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos en los animales ya que las dos rutas están reguladas recíprocamente tal como se describe más adelante.

Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable al acetil-CoA, una lanzadera indirecta transfiere equivalentes de grupo acetilo a través de la membrana interna **(Fig. 21-10)**. El acetil-CoA intramitocondrial reacciona primero con el oxolacetato para formar citrato en la reacción del ciclo del ácido cítrico catalizada por la **citrato sintasa** (véase la Fig. 16-9).

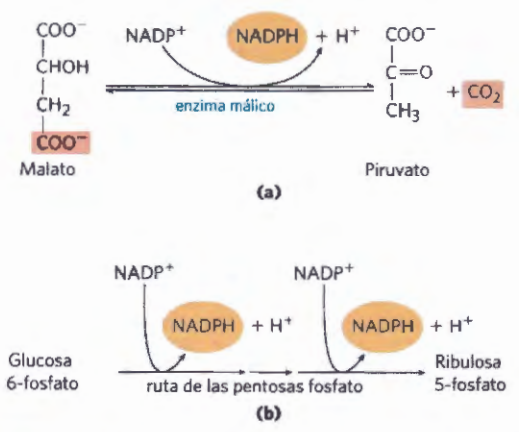


FIGURA 21-9 Producción de NADPH. Dos rutas para obtener NADPH catalizadas por **(a)** enzima málico y **(b)** ruta de las pentosas fosfato.

El citrato pasa entonces al citosol a través de la membrana mitocondrial interna mediante el **transportador de citrato**. En el citosol, la rotura del citrato por la **citrato liasa** regenera acetil-CoA y oxalacetato en una reacción dependiente de ATP. El oxalacetato no puede volver a la matriz mitocondrial directamente ya que no hay ningún transportador de oxalacetato. En su lugar la malato deshidrogenasa citosólica reduce el oxalacetato a malato, que puede volver a la matriz mitocondrial a través del transportador malato-α-cetoglutarato en intercambio con citrato. En la matriz el malato se reoxida a oxalacetato para completar el intercambio. No obstante, la mayor parte del malato producido en el citosol se utiliza para generar NADPH citosólico mediante la actividad del enzima málico (Fig. 21-9a). El piruvato producido se transporta a la mitocondria por el transportador de piruvato (Fig. 21-10) y se vuelve a convertir en oxalacetato por la piruvato carboxilasa de la matriz. En el ciclo resultante se consumen dos moléculas de ATP (por la citrato liasa y la piruvato carboxilasa) por cada molécula de acetil-CoA suministrado para la síntesis de ácidos grasos. Después de la rotura del citrato que genera acetil-CoA, la conversión de los cuatro carbonos restantes en piruvato y CO_2 por el enzima málico genera alrededor de la mitad del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos. El resto de NADPH necesario lo proporciona la ruta de las pentosas fosfato.

La biosíntesis de ácidos grasos está muy regulada

Cuando una célula u organismo tiene más combustible metabólico del requerido para sus necesidades energéticas, el exceso se convierte generalmente en ácidos grasos que se almacenan en forma de lípidos tales como los triacilgliceroles. La reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa es el paso limitante de velocidad en la biosíntesis de los ácidos grasos, y este enzima es un importante sitio de regulación. En los vertebrados el palmitil-CoA, principal producto de la síntesis de ácidos grasos, actúa como retroinhibidor del enzima, mientras que el citrato es un activador alostérico que aumenta la V_{max} **(Fig. 21-11a)**. El citrato juega un papel central en la desviación del metabolismo celular desde el consumo (oxidación) del combustible metabólico hasta su almacenamiento en forma de ácidos grasos. Cuando hay un aumento en las concentraciones mitocondriales de acetil CoA y ATP, el citrato se transporta fuera de la mitocondria; allí se convierte entonces tanto en un precursor de acetil-CoA citosólico, como en una señal alostérica para la activación de la acetil-CoA carboxilasa. Al mismo tiempo, el citrato inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa-1 (véase la Fig. 15-16),y así se reduce el flujo de carbono a través de la glucólisis.

La acetil-CoA carboxilasa está también regulada por modificación covalente. La fosforilación, desencadenada por las hormonas glucagón y adrenalina, inactiva el enzima con lo que reduce su sensibilidad a la activación por citrato lo que hace que la síntesis de ácidos grasos sea más lenta. En su forma activa (desfosforilada), la acetil-CoA carboxilasa se polimeriza dando lugar a filamentos largos (Fig. 21-11b); la fosforilación va acompañada de la disociación en subunidades monoméricas con pérdida de actividad.

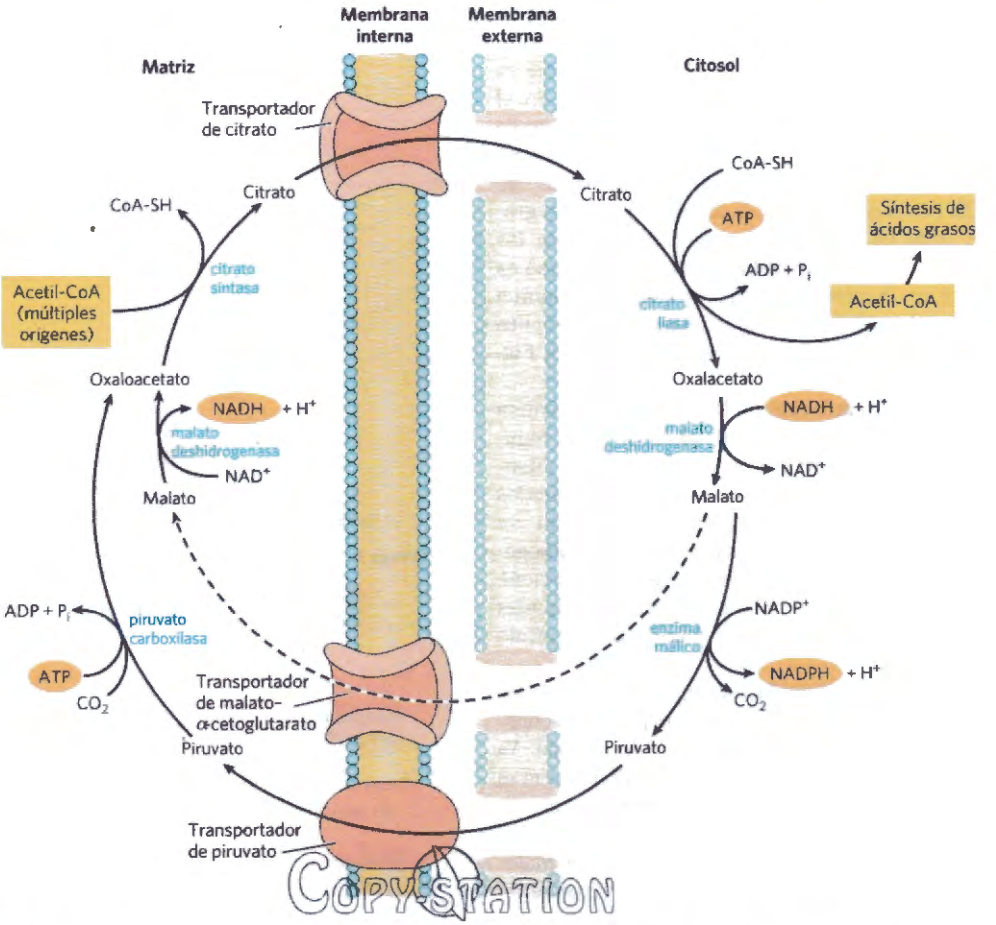


FIGURA 21-10 Lanzadera para la transferencia de grupos acetilo desde la mitocondria hasta el citosol. La membrana externa mitocondrial es permeable a todos estos compuestos. El piruvato procedente del catabolismo de los aminoácidos en la matriz mitocondrial, o de la glucosa por la glucólisis en el citosol, se convierte en acetil-CoA en la matriz. Los grupos acetilo salen de la mitocondria en forma de citrato; en el citosol se liberan en forma de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. El oxalacetato se reduce a malato que puede volver a la matriz mitocondrial y se convierte en oxalacetato. El destino principal del malato citosólico es la oxidación por el enzima málico para generar NADPH citosólico; el piruvato producido vuelve a la matriz mitocondrial.

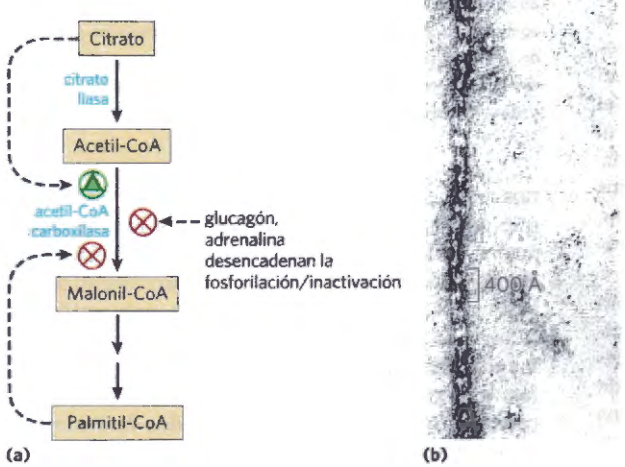


FIGURA 21-11 Regulación de la síntesis de ácidos grasos. **(a)** En las células de los vertebrados, tanto la regulación alostérica como la modificación covalente dependiente de hormonas, influyen en el flujo de precursores hasta malonil-CoA. En las plantas, la acetil-CoA carboxilasa se activa por los cambios en $[Mg^{2+}]$ y pH que acompañan la iluminación (no se muestran aquí). **(b)** Filamentos de acetil-CoA carboxilasa de hepatocitos de gallina (en la forma activa, desfosforilada) tal como se ven por microscopia electrónica. [Fuente: Cortesía de James M. Ntambi, Ph.D. Professor of Biochemistry, Steenbock Professor of Nutritional Sciences, University of Wisconsin-Madison].

La acetil-CoA carboxilasa de plantas y bacterias no está regulada por el citrato o por un ciclo de fosforilación-desfosforilación. En su lugar el enzima vegetal es activado por un incremento del pH y la $[Mg^{2+}]$ en el estroma, procesos ambos que se producen cuando se ilumina la planta (véase la Fig. 20-44). Las bacterias no utilizan triacilgliceroles como almacenamiento de energía. El papel principal de la síntesis de ácidos grasos en *E. coli* es proporcionar precursores para los lípidos de membrana; la regulación de este proceso es compleja, y en é intervienen nucleótidos de guanina (tales como el ppGpp) que coordinan el crecimiento celular con la formación de membranas (véase la Fig. 8-42).

Además de la regulación de la actividad enzimática de manera continua, estas rutas metabólicas están reguladas a nivel de la expresión génica. Por ejemplo, cuando los animales ingieren un exceso de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, se suprime la expresión de genes que codifican un amplio grupo de enzimas lipogénicos en el hígado. En esta regulación génica interviene una familia de proteínas receptoras nucleares llamadas PPAR que se describen con mayor detalle en el Capítulo 23 (véase la Fig. 23-43).

Si la síntesis y la β-oxidación de los ácidos grasos tuviesen lugar simultáneamente los dos procesos constituirían un ciclo inútil, con despilfarro de energía. Ya observamos anteriormente (véase la Fig. 17-13) que el malonil-CoA bloquea la β-oxidación al inhibir la carnitina aciltransferasa I. Así, durante la síntesis de ácidos grasos la producción del primer intermediario, el malonil-CoA, detiene la β oxidación al nivel del sistema de transporte en la membrana mitocondrial interna. Este mecanismo de control ilustra otra ventaja para la célula de la separación de rutas sintéticas y degradativas en diferentes compartimientos celulares.

Los ácidos grasos de cadena larga se sintetizan a partir del palmitato

El palmitato, producto principal del sistema de la ácido graso sintasa en las células animales, es el precursor de otros ácidos grasos de cadena larga **(Fig. 21-12)**. Puede ser alargado para formar estearato (18:0) o incluso ácidos grasos saturados más largos mediante adiciones sucesivas de grupos acetilo, por acción de los **sistemas de alargamiento de ácidos grasos** presentes en el retículo endoplasmático liso y en la mitocondria. El sistema de alargamiento más activo en el RE alarga la cadena de 16 carbonos del palmitil-CoA con dos carbonos, dando lugar al estearil-CoA. Aunque se utilizan diferentes sistemas enzimáticos, y el coenzima A es el transportador de acilos en la reacción, no la ACP, el mecanismo de alargamiento en el RE es, por lo demás, idéntico al de la síntesis del palmitato: donación de dos carbonos por el malonil-CoA, seguida de reducción, deshidratación y reducción para dar el producto saturado de 18 carbonos, estearil-CoA.

Dos productos clave de las rutas de alargamiento son el linoleato, un ácido graso omega-6 (véase el Capítulo 10 para la nomenclatura alternativa) y el α-linolenato, un ácido graso omega-3. Estos son precursores de dos grandes familias de derivados de ácidos grasos insaturados, las familias omega-6 y omega-3. Los humanos no pueden sintetizar linoleato ni α-linolenato por lo que deben obtenerlos de la dieta. Si la proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 en la dieta es demasiado elevada, puede conducir a enfermedades cardiovasculares. La importancia de esta proporción puede reflejar la multitud de moléculas señalizadoras en las familias omega-6 y omega-3 (Fig. 21-12) con sus igualmente complejos efectos fisiológicos. Más adelante se consideran algunos de estos derivados de ácidos grasos insaturados.

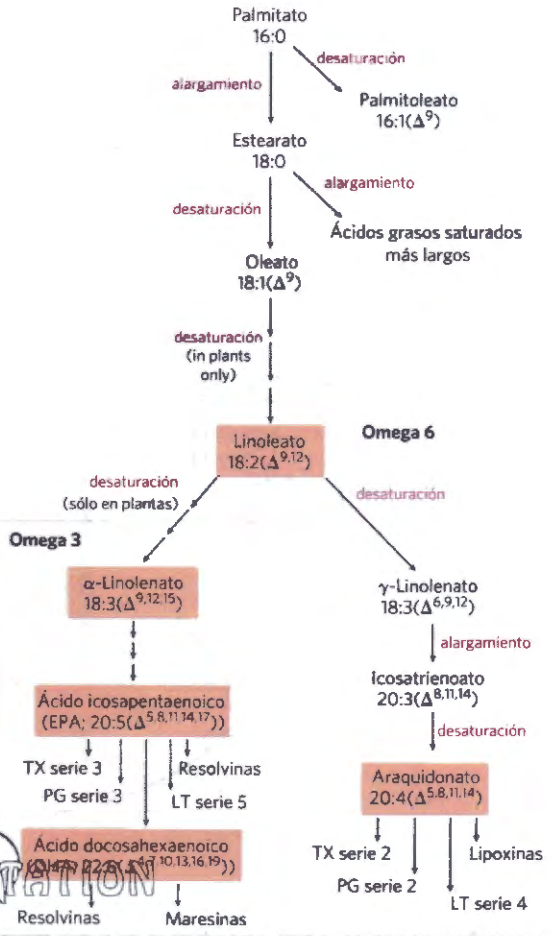


FIGURA 21-12 Rutas de síntesis de ácidos grasos insaturados y sus derivados. El palmitato es el precursor del estearato y otros ácidos grasos saturados de cadena más larga, así como de los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleato y oleato. Los mamíferos no pueden convertir el oleato en linoleato o α-linolenato (sombreados en rosa), por lo que son requeridos en la dieta como ácidos grasos esenciales. Se esquematiza la conversión del linoleato en otros ácidos grasos poliinsaturados e icosanoides. Los ácidos grasos insaturados se simbolizan indicando el número de carbonos y el número y posición de los dobles enlaces, según la Tabla 10-1. El linoleato y el α-linolenato son importantes ácidos grasos omega-6 y omega-3, respectivamente; también son precursores de una amplia gama de ácidos grasos insaturados que actúan como moléculas señalizadoras. Las abreviaturas de dos letras especifican las prostaglandinas icosanoides (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT). Clases concretas de ácidos grasos insaturados están delineadas por el número de dobles enlaces, que definen las subclases referidas como series. Por ejemplo, la serie 2 TX, son tromboxanos con dos dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada.

COPY-STATION

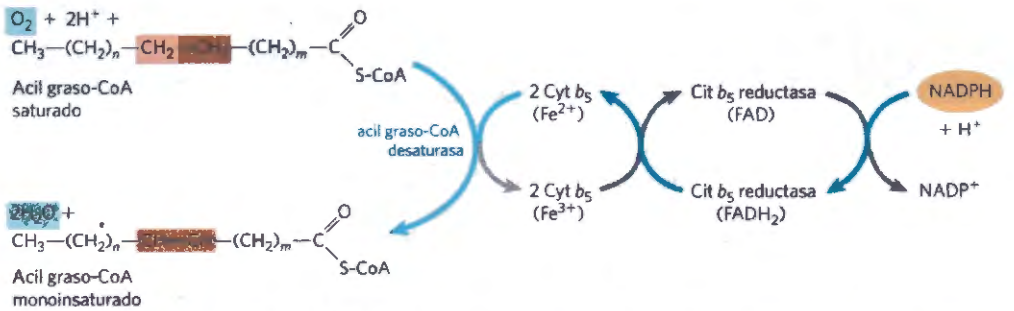


FIGURA 21-13 Transferencia de electrones en la desaturación de ácidos grasos en los vertebrados. Las flechas azules muestran la ruta de los electrones cuando dos sustratos, un acil graso-CoA y NADPH, son oxidados por el oxígeno molecular. Estas reacciones se dan en la cara de la luz del RE liso. En las plantas tiene lugar una ruta similar, pero con transportadores de electrones diferentes.

La desaturación de los ácidos grasos necesita una oxidasa de función mixta

El palmitato y el estearato son los precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más abundantes en los tejidos animales: el palmitoleato, 16:1(D^9), y el oleato, 18:1(D^9). Estos ácidos grasos tienen un único doble enlace cis entre C-9 y C-10 (véase la Tabla 10-1). El doble enlace es introducido en la cadena del ácido graso mediante una reacción oxidativa catalizada por la **acil graso-CoA desaturasa (Fig. 21-13)**, una **oxidasa de función mixta** (Recuadro 21-1).Dos sustratos diferentes, el ácido graso y el NADPH, experimentan simultáneamente oxidaciones de dos electrones. La ruta del flujo electrónico incluye un citocromo (citocromo b_5) y una flavoproteína (citocromo b_5 reductasa) que, al igual que la acil graso-CoA desaturasa, están presentes en el RE liso. En las plantas, el oleato (18:1(Δ^9) se produce gracias a una **estearil-ACP desaturasa (SCD)** que utiliza ferredoxina reducida como dador de electrones en el estroma del cloroplasto.

La SCD de animales (según se ha estudiado en el ratón) tiene un papel importante en el desarrollo de la obesidad y en la resistencia a la insulina que acompaña a menudo la obesidad y precede al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Los ratones tienen cuatro isozimas, de SCD1 a SCD4, de los que SCD1 es el mejor conocido. Su síntesis es inducida por los ácidos grasos saturados de la dieta, así como por la acción de SREBP y LXR, dos reguladores proteicos del metabolismo lipídico que activan la transcripción de enzimas de la síntesis de lípidos (descritos en la Sección 21.4) Los ratones con formas mutantes de SCD1 son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y no desarrollan diabetes en condiciones que producen tanto obesidad como diabetes en ratones con SCD1 normal. ■

Los hepatocitos de mamífero pueden introducir fácilmente dobles enlaces en la posición D^9 de los ácidos grasos, pero no pueden introducir dobles enlaces adicionales entre el C-10 y el extremo metilo terminal. Así, tal como se señalado anteriormente, los mamíferos no pueden sintetizar linoleato, 18:2 ($D^{9,12}$), precursor de la familia omega-6, ni α-linolenato, 18:3 ($D^{9,12,15}$), precursor de la familia omega-3, aunque ambos pueden ser sintetizados por las plantas. Las desaturasas que introducen dobles enlaces en las posiciones D^{12} y D^{15} están localizadas en el RE y los cloroplastos. Los enzimas del RE no actúan sobre los ácidos grasos libres sino sobre un fosfolípido, la fosfatidilcolina, que contiene al menos un oleato unido al glicerol **(Fig. 21-14)**. Tanto las plantas como las bacterias deben sintetizar ácidos grasos poliinsaturados para asegurar la fluidez de la membrana a bajas temperaturas.

Debido a que son precursores necesarios para la síntesis de otros productos, el linoleato y el α-linolenato son **ácidos grasos esenciales** para los mamíferos; deben ser obtenidos a partir de materiales vegetales en la dieta. Una vez ingerido el linoleato puede convertirse en otros ácidos grasos poliinsaturados, especialmente γ-linolenato, icosatrienoato y **araquidonato (icosate-**

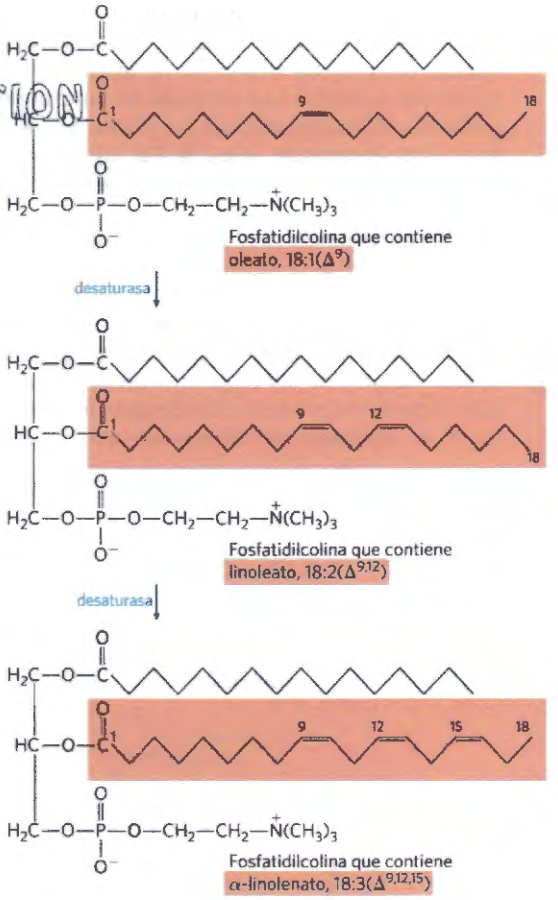


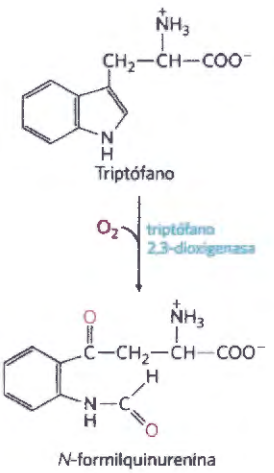
FIGURA 21-14 Acción de las desaturasas vegetales. Las desaturasas vegetales oxidan el oleato unido a la fosfatidilcolina, produciendo ácidos grasos poliinsaturados. Algunos de los productos se liberan de la fosfatidilcolina por hidrólisis.

RECUADRO 21-1 MEDICINA Oxidasas de función mixta, enzimas citocromo P-450 y sobredosis de fármacos

En este capítulo nos encontramos con varios enzimas que llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción en las que interviene el oxígeno molecular. Una de estas reacciones es la de la estearil-CoA desaturasa (SCD) que introduce un doble enlace en una cadena acilo graso (véase la Fig. 21-13).

La nomenclatura de los enzimas que catalizan reacciones de este tipo general es, a menudo, confusa para los estudiantes, al igual que el mecanismo de las reacciones. **Oxidasa** es el nombre general de los enzimas que catalizan oxidaciones en las que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones aunque los átomos de oxígeno no aparezcan en el producto oxidado. El enzima que genera un doble enlace en el acil graso-CoA durante la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas (véase la Fig. 17-14) es una oxidasa de este tipo; un segundo ejemplo es la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial (véase la Fig. 19-13). En el primer caso, la transferencia de dos electrones al H_2O produce peróxido de hidrógeno, H_2O_2; en el segundo, dos electrones reducen $\frac{1}{2}O_2$ a H_2O. Una gran parte de las oxidasas, aunque no todas, son flavoproteínas. Las **oxidasas de función mixta** oxidan dos sustratos diferentes de forma simultánea; una vez más, los átomos del oxígeno molecular no aparecen en los productos oxidados. Las oxidasas de función mixta actúan en la desaturación de los ácidos grasos (acil graso-CoA desaturasa; véase la Fig. 21-13) y en el último paso de la síntesis de plasmalógenos (véase la Fig. 21-30).

Las **oxigenasas** catalizan reacciones oxidativas en las que átomos de oxígeno *se* incorporan directamente a la molécula de producto formando, por ejemplo, un nuevo grupo hidroxilo o carboxilo. Las **dioxigenasas** catalizan reacciones en las que los dos átomos de oxígeno del O_2 se incorporan en la molécula orgánica de producto. Un ejemplo de dioxigenasa es la triptófano 2,3-dioxigenasa que cataliza la apertura del anillo pentaatómico del triptófano en el catabolismo de este aminoácido. Cuando la reacción tiene lugar en presencia de $^{18}O_2$, los átomos de oxígeno isotópicos se encuentran en los dos grupos carbonilo del producto (en rojo):



Las **monooxigenasas,** que son más abundantes y complejas en su acción, catalizan reacciones en las que sólo uno de los dos átomos de oxígeno del O_2 se incorpora al producto orgánico, siendo el otro reducido a H_2O; un ejemplo es la escualeno monooxigenasa (véase la Fig. 21-37). Las monooxigenasas requieren dos sustratos que actúan como reductores de los dos átomos de oxígeno del O_2. El sustrato principal acepta uno de los dos átomos de oxígeno de oxígeno mientras que un cosustrato aporta átomos de hidrógeno para reducir el otro átomo de oxígeno a H_2O. La ecuación general de las monooxigenasas es

$$AH + BH_2 + O{-}O \longrightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

en donde AH es el sustrato principal y BH_2 el cosustrato. Debido a que la mayoría de monooxigenasas catalizan reacciones en las que se hidroxila el sustrato principal, también se denominan **hidroxilasas**. A veces también se las denomina **oxidasas de función mixta** u **oxigenasas de función mixta**, para indicar que oxidan simultáneamente dos sustratos diferentes.

COPY-STATION

Las monooxigenasas se dividen en diferentes clases según la naturaleza del cosustrato. Algunas utilizan nucleótidos de flavina reducidos ($FMNH_2$ o $FADH_2$), otros usan NADH o NADPH y otras utilizan α-cetoglutarato como cosustrato. El enzima que hidroxila el anillo fenilo de la fenilalanina para dar tirosina es una monooxigenasa que utiliza tetrahidrobiopterina como cosustrato (véase la Fig. 18-23). (Éste es el enzima defectuoso en la enfermedad genética humana fenilcetonuria).

Las reacciones de monooxigenación más numerosas y complejas son las que emplean un tipo de proteína hemo denominada **citocromo P-450.** Al igual que la citocromo oxidasa mitocondrial, los enzimas que contienen un dominio citocromo P-450 pueden reaccionar con O_2 y unir monóxido de carbono, pero se diferencian de la citocromo oxidasa en que el complejo con el monóxido de carbono de su forma reducida absorbe la luz intensamente a 450 nm; de ahí el nombre P-450.

Los enzimas citocromo P-450 catalizan reacciones de hidroxilación en las que un sustrato orgánico RH se hidroxila a R-OH, incorporando un átomo de oxígeno del O_2; el otro átomo de oxígeno se reduce a H_2O por acción de equivalentes de reducción aportados por el NADH o el NADPH pero que normalmente pasan al citocromo P-450 mediante una proteína ferro-sulfurada. La Figura 1 muestra un esquema simplificado de la acción del citocromo P-450, en la que hay pasos intermedios no totalmente caracterizados.

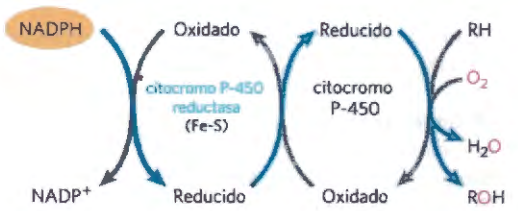


FIGURA 1

Una gran familia de proteínas que contienen P-450 consta de dos tipos generales: las que son muy específicas de un solo sustrato (como los enzimas típicos) y las que tienen sitios de unión más promiscuos ya que aceptan diferentes sustratos, generalmente todos de tipo hidrofóbico. En la corteza suprarrenal, por ejemplo, un citocromo P-450 específico participa en la hidroxilación de esteroides para producir hormonas adrenocorticales (véase la Fig. 21-49). Existen docenas de enzimas P-450 que actúan sobre sustratos específicos en las rutas biosintéticas de las hormonas esteroideas y de icosanoides (Fig. 2). Enzimas citocromo P-450 con una especificidad más amplia son importantes en la hidroxilación de muchos tipos diferentes de fármacos, tales como los barbituratos y otros xenobióticos (sustancias extrañas al organismo), especialmente si son hidrofóbicos y relativamente insolubles. El carcinógeno ambiental benzo[*a*]pireno (que se encuentra en el humo del tabaco) es hidroxilado por el citocromo P-450 durante su destoxificación. La hidroxilación de los xenobióticos, a veces combinada con la unión de un compuesto polar tal como el ácido glucurónico al grupo hidroxilo, los hace más hidrosolubles lo que permite su excreción en la orina. La hidroxilación (y la glucuronidación) inactiva la mayoría de fármacos, y la velocidad a la que esto ocurre puede determinar el tiempo en el que una dosis dada de medicamento permanece en la sangre a niveles terapéuticos.

Los humanos difieren en sus niveles de enzimas metabolizadores de medicamentos, tanto por su genética como porque una exposición anterior a los sustratos puede inducir la síntesis de enzimas P-450 en mayores cantidades en un individuo dado. Tanto el etanol como los barbituratos comparten un enzima P-450. La bebida en exceso induce, a largo plazo, la síntesis de ese enzima P-450. Dado que el barbiturato se inactiva y elimina más rápidamente, se requieren mayores dosis del medicamento para conseguir el mismo efecto terapéutico. Si un individuo toma esta dosis de barbiturato superior a la habitual y, a continuación, también bebe alcohol, la competición entre el alcohol y el barbiturato por la cantidad limitada de enzima significa que tanto el alcohol como el barbiturato se eliminan más lentamente. Los elevados niveles resultantes de estos dos deprimidores del sistema nervioso central pueden ser letales. Aparecen complicaciones similares cuando un individuo toma dos fármacos que son inactivados por el mismo enzima P-450; cada fármaco aumenta la dosis efectiva del otro al hacer más lenta su inactivación. Es, por tanto, esencial que el médico y el farmacéutico conozcan todo lo que se ha prescrito al paciente así como los medicamentos de mostrador (sin receta) y suplementos (y también si bebe en exceso, fuma o está expuesto a toxinas ambientales).

COPYSTATION

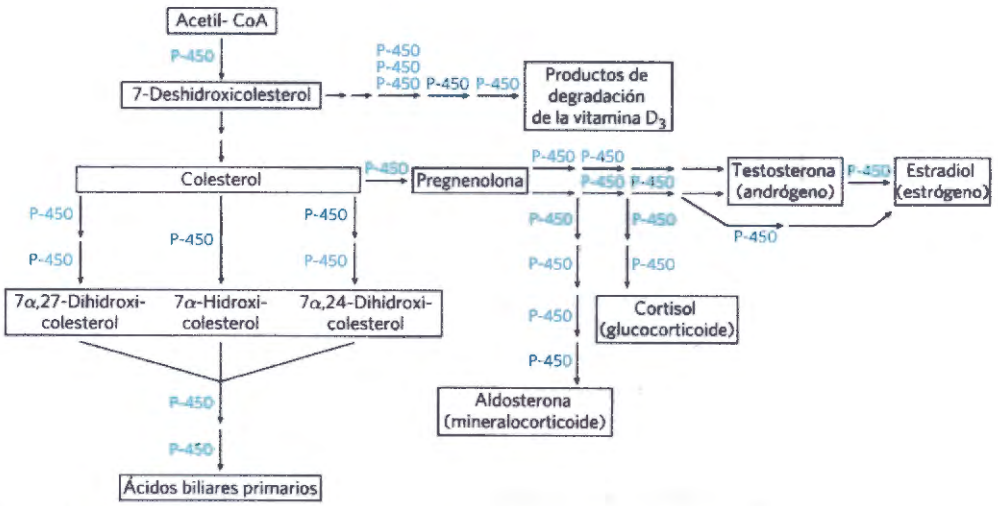


FIGURA 2 Rutas de biosíntesis de esteroides en las que se muestran los pasos que requieren enzimas citocromo P-450.

traenoato), que pueden producirse todos ellos a partir del linoleato (Fig. 21-12). De modo semejante, el α-linolenato se convierte en dos derivados importantes, **ácido icosapentaenoico (EPA)** y **ácido docosahexaenoico (DHA).** Araquidonato, 20:4 ($D^{5,8,11,14}$), EPA, 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) y DHA, 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) son precursores esenciales de distintas clases de icosanoides (Fig. 21-12), lípidos con funciones reguladoras importantes. Los ácidos grasos de 20 y 22 carbonos se sintetizan a partir del linoleato y del α-linolenato mediante reacciones de alargamiento de ácidos grasos análogas a las descritas en la página 820.

Los icosanoides se forman a partir de ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 carbonos

Los icosanoides son una familia de moléculas de señalización biológica muy potentes que actúan como mensajeros de corto alcance y que afectan a tejidos cercanos a las células que los producen.

En respuesta a estímulos hormonales o de otro tipo la fosfolipasa A_2, presente en la mayor parte de células de mamífero, ataca los fosfolípidos de membrana liberando araquidonato del carbono central del glicerol. A continuación, enzimas del RE liso convierten el araquidonato en **prostaglandinas**, empezando con la formación de prostaglandina H_2 (PGH_2), que es el precursor inmediato de otras muchas prostaglandinas y de los tromboxanos **(Fig. 21-15a)**. Las dos reacciones que dan lugar a PGH_2 están catalizadas por un enzima bifuncional, la **ciclooxigenasa (COX)**, también denominada **prostaglandina H_2 sintasa**. En el primero de estos dos pasos, la actividad ciclooxigenasa introduce oxígeno molecular para convertir el araquidonato en PGG_2. El segundo paso, catalizado por la actividad peroxidasa de la COX, convierte PGG_2 en PGH_2.

›› Convención clave: Las prostaglandinas con diferentes grupos funcionales en el anillo reciben diferentes designaciones por medio de letras: A, B, C, D, E, F, G, H y R. El subíndice numeral que sigue a la letra, como en PGH_2 y PGG_2 indica el número de dobles enlaces. Las prostaglandinas con dos dobles enlaces, todas ellas derivadas del araquidonato, se conocen como prostaglandinas de la serie 2; las que tienen tres dobles enlaces, procedentes del EPA, son la serie 3 (Fig. 21-12). Se utilizan patrones de nomenclatura similares para otras clases de icosanoides descritas más adelante. ‹‹

Las prostaglandinas de la serie 2 tienen papeles importantes en la respuesta inmediata al estrés o lesiones, incluida la inflamación, dolor, hinchazón y dilatación de los vasos sanguíneos. Las prostaglandinas de la serie 3, en general, actúan más lentamente y normalmente de forma moderada a respuestas asociadas con prostaglandinas de la serie 2.

COPY-STATION

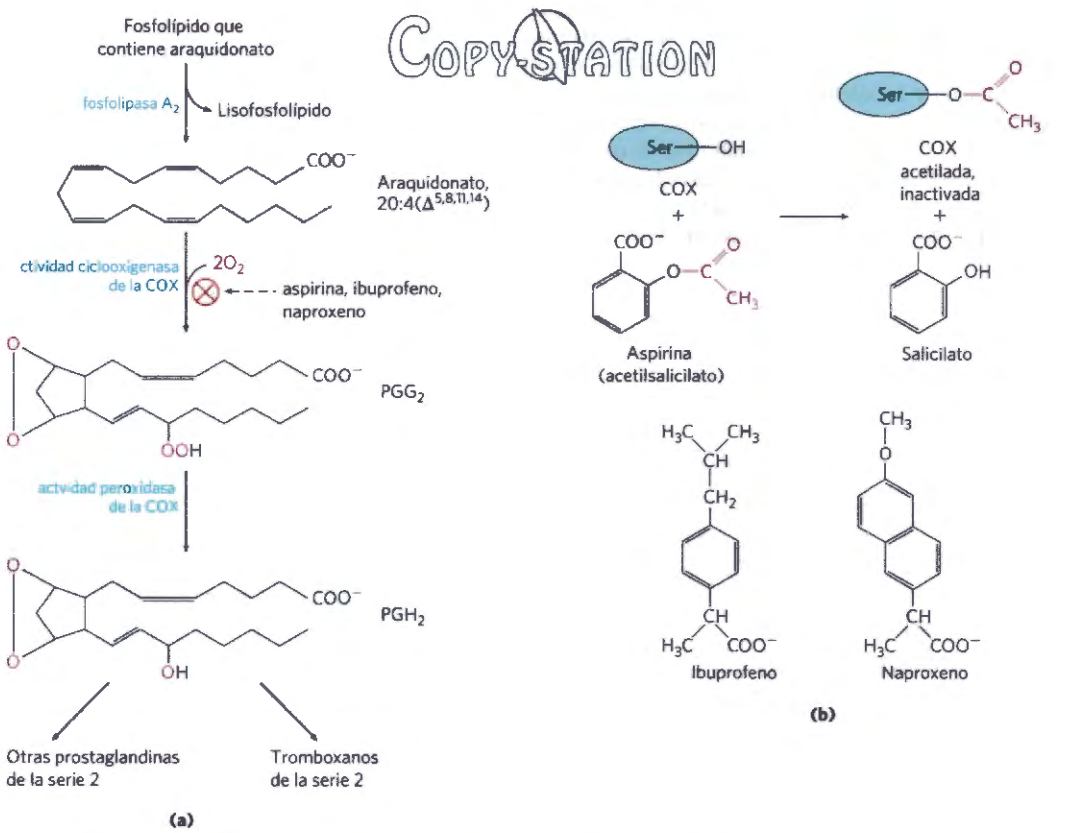


FIGURA 21-15 Ruta "cíclica" desde el araquidonato hasta las prostaglandinas y tromboxanos. (a) Después de la liberación del araquidonato de los fosfolípidos por acción de la fosfolipasa A_2, las actividades ciclooxigenasa y peroxidasa de la COX (también denominada prostaglandina H_2 sintasa) catalizan la producción de PGH_2, el precursor de otras prostaglandinas y tromboxanos. **(b)** La aspirina inhibe la primera reacción acetilando un residuo Ser esencial en el enzima. El ibuprofeno y el naproxeno inhiben el mismo paso, probablemente imitando la estructura del sustrato o de un intermedio de la reacción.

Los mamíferos tienen dos isozimas de la prostaglandina H_2 sintasa, la COX-1 y la COX-2. Las dos tienen funciones diferentes pero las secuencias de aminoácidos son muy parecidas (60% a 65% de identidad de secuencia) y los mecanismos de reacción en sus sitios catalíticos son similares. La COX-1 es responsable de la síntesis de las prostaglandinas que regulan la secreción de mucina gástrica y la COX-2 de las prostaglandinas que intervienen en la inflamación, dolor y fiebre.

Se puede aliviar el dolor inhibiendo la COX-2. El primer medicamento que fue comercializado a gran escala para este fin fue la aspirina (acetilsalicilato; Fig. 21-15b). El nombre aspirina (de *a* de acetil y *spir* de *Spirsaüre*, palabra alemana utilizada para los salicilatos de la planta *Spiraea ulmaria*) apareció en 1899 año de introducción de este fármaco por la compañía Bayer. La aspirina inactiva irreversiblemente la actividad ciclooxigenasa de los dos isozimas COX al acetilar un residuo Ser y bloquear el sitio activo de cada enzima, lo que inhibe, por tanto, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. El ibuprofeno, fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID, "non-esteroidal antiinflammatory drugs"; Fig. 21-15b) muy utilizado, inhibe el mismo par de enzimas. No obstante, la inhibición de COX-1 puede tener efectos secundarios indeseables entre los que se incluyen irritación del estómago y otras consecuencias más graves. En la década de 1990 se desarrollaron compuestos NSAID con una mayor especificidad hacia COX-2 como terapias avanzadas contra el dolor agudo. Se aprobaron tres medicamentos de este tipo para uso a escala global: rofecoxib (Vioxx), valdecoxib (Bextra) y celecoxib (Celebrex). Aunque al principio se consideraron un gran éxito, Vioxx y Bextra se retiraron del mercado ya que informes de campo y estudios clínicos establecieron conexiones entre los fármacos y un aumento en el riesgo de infarto de miocardio e ictus. Celebrex continúa en el mercado pero se utiliza con mayores precauciones. Las razones concretas de los problemas con estos fármacos aún no están claras. Sin embargo, investigaciones continúan revelando tanto la existencia de nuevos icosanoides como nuevos modos de acción. Los problemas con los inhibidores avanzados de la COX-2 sirven de nota de precaución. Cada vez somos más conscientes de la complejidad de la red de estas interacciones señalizadoras por lo que la predicción de las de apuntar a componentes específicos con agentes farmacológicos continúa siendo un proceso imperfecto.

La **tromboxano sintasa**, presente en las plaquetas sanguíneas (trombocitos) convierte la PGH_2 en tromboxano A_2, del que derivan otros **tromboxanos** de la serie 2 (Fig. 21-15a). Los tromboxanos de la serie 2 inducen la constricción de los vasos sanguíneos y la agregación plaquetaria, etapas iniciales de la coagulación de la sangre. Dosis bajas de aspirina, tomadas regularmente, reducen la probabilidad de ataques de corazón e ictus al reducir la producción de tromboxanos. ■

Los tromboxanos, al igual que las prostaglandinas, contienen un anillo de cinco o seis átomos; la ruta que conduce desde el araquidonato hasta estas dos clases de compuestos es a veces denominada ruta "cíclica", para distinguirla de la ruta "lineal" que, a partir del araquidonato, da lugar a los **leucotrienos**, que son compuestos lineales **(Fig. 21-16)**. La síntesis de leucotrienos comienza con la acción de varias lipoxigenasas que catalizan la incorporación de oxígeno molecular en el araquidonato. Estos enzimas, que se encuentran en los leucocitos y en el corazón, cerebro, pulmón y bazo, son oxidasas de función mixta que utilizan el citocromo P-450 (Recuadro 21-1). Los distintos leucotrienos difieren en la posición del grupo peróxido introducido por las lipoxigenasas. Esta ruta lineal desde el araquidonato, a diferencia de la ruta cíclica, no es inhibida por la aspirina ni por los otros NSAID

Los organismos patógenos así como los agentes irritantes tales como la contaminación del aire o el humo del tabaco, desencadenan una respuesta inflamatoria en el tejido afectado que consta de dos fases: inicio y resolución. Los icosanoides de la familia omega-6 son críticos para el inicio, jugando papeles clave en el reclutamiento de leucocitos, haciendo que los vasos sanguíneos sean más permeables y estimulando la quimiotaxis y migración de las células del sistema inmune. Cuando la fuente de la lesión al tejido está ya bajo control, se ha de resolver la inflamación y el retorno del tejido a su estado normal. La resolución de la inflamación es promovida por varias clases de moléculas señalizadoras; prominentes entre ellas se encuentran varios leucotrienos y prostaglandinas. Muchos icosanoides de la famila omega-3 (incluidas las prostaglandinas y tromboxanos de la serie tres) son antiinflamatorios, si bien la clasificación no es absoluta; determinados icosanoides pueden ser inflamatorios en un tejido y antiinflamatorios en otro. La fase de resolución también utiliza un conjunto de icosanoides descubiertos recientemente denominados **mediadores pro-resolutorios especia-**

Copyright

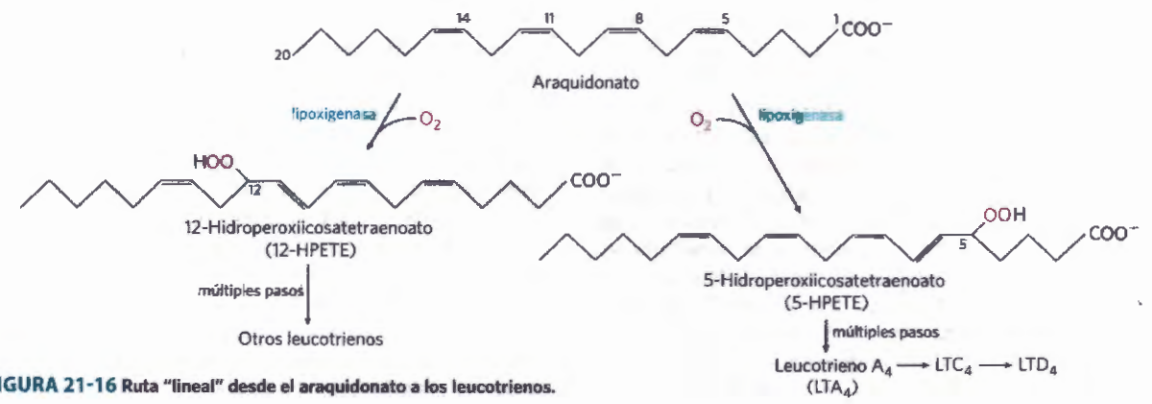


FIGURA 21-16 Ruta "lineal" desde el araquidonato a los leucotrienos.

lizados (SPM). La primera familia de SPM descubierta fueron las lipoxinas, seguida más recientemente por las resolvinas, protectinas y maresinas. Todos los SPM provienen de ácidos grasos esenciales (Fig. 21-12). Afectan diferentes células y tejidos diana de maneras diversas. La suma de sus acciones es promover la eliminación de residuos, microbios y células muertas con el fin de restaurar la integridad de los vasos sanguíneos y regenerar el tejido. Los SPM también reducen el dolor y la fiebre y son, por tanto, de gran interés como dianas farmacológicas. ■

Las plantas también producen importantes moléculas de señalización a partir de los ácidos grasos. Al igual que en los animales, un paso clave en el inicio de la señalización implica la activación de una fosfolipasa específica. En las plantas el sustrato ácido graso utilizado es el α-linolenato. Una lipoxigenasa cataliza a continuación el primer paso de una ruta que convierte el linolenato en jasmonato una sustancia de la que se sabe que tiene funciones de señalización en la defensa contra insectos, la resistencia contra patógenos fúngicos y en la maduración del polen. El jasmonato también afecta a la germinación de las semillas, al crecimiento de la raíz y al desarrollo de frutos y semillas.

RESUMEN 21.1 Biosíntesis de ácidos grasos e icosanoides

■ Los ácidos grasos saturados de cadena larga se sintetizan a partir del acetil-CoA por un sistema citosólico de seis actividades enzimáticas más una proteína transportadora de acilos (ACP). Hay dos tipos de ácido graso sintasa. FAS I, se encuentra en vertebrados y hongos y está formada por polipéptidos multifuncionales. La FAS II es un sistema disociado que se encuentra en bacterias y plantas. Ambas contienen dos tipos de grupos —SH (uno proporcionado por la fosfopanteteína de la ACP y el otro por un residuo Cys del enzima β-cetoacil-ACP sintasa) que funcionan como transportadores de los intermediarios acilo graso.

■ El malonil-ACP, formado a partir del acetil-CoA (exportado de la mitocondria) y CO_2, se condensa con un acetilo ligado al —SH de la Cys para dar lugar a acetoacetil-ACP con liberación de CO_2. A ello le sigue la reducción al derivado D-β-hidroxi, su deshidratación al *trans*-D^2-acil-ACP insaturado y reducción a butiril-ACP. En los dos pasos de reducción el NADPH es el dador de electrones. La síntesis de ácidos grasos está regulada al nivel de la formación del malonil-CoA.

■ Seis moléculas más de malonil-ACP reaccionan sucesivamente en el extremo carboxilo de la cadena de ácido graso en crecimiento hasta formar palmitil-ACP, producto final de la reacción de la ácido graso sintasa. El palmitato libre se separa por hidrólisis.

■ El palmitato se puede alargar para dar el estearato de 18 carbonos. El palmitato y el estearato pueden, a su vez, ser desaturados dando palmitoleato y oleato, respectivamente, por acción de oxidasas de función mixta.

■ Los mamíferos no pueden sintetizar linoleato que deben obtener de fuentes vegetales para convertirlo en araquidonato, compuesto que da lugar a la familia de los icosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y mediadores pro-resolutorios especializados) con una función señalizadora muy potente. La síntesis de prostaglandinas y tromboxanos es inhibida por los NSAID que actúan sobre la actividad ciclooxigenasa de la protaglandina H_2 sintasa.

21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles

La mayor parte de ácidos grasos sintetizados o ingeridos por un organismo tienen uno de estos dos destinos: incorporación en triacilgliceroles para el almacenamiento de energía metabólica o incorporación en los fosfolípidos componentes de las membranas. El reparto entre estos destinos alternativos depende de las necesidades momentáneas del organismo. Durante el crecimiento rápido la síntesis de nuevas membranas requiere la síntesis de fosfolípidos de membrana; los organismos que tienen un aporte abundante de alimento pero no se hallan en fase de crecimiento activo desvían la mayor parte de sus ácidos grasos hacia grasas de almacenamiento. Ambas rutas comienzan en el mismo punto: la formación de ésteres acilo graso del glicerol. En esta sección examinaremos la ruta hacia los triacilgliceroles y su regulación así como la producción de glicerol 3-fosfato en el proceso de la gliceroneogénesis.

Los triacilgliceroles y glicerofosfolípidos se sintetizan a partir de los mismos precursores

Los animales pueden sintetizar y almacenar grandes cantidades de triacilgliceroles para usarlos posteriormente como combustible (véase el Recuadro 17-1). En los humanos sólo se pueden almacenar unos pocos hectogramos de glucógeno en el hígado y en el músculo, apenas suficientes para suministrar las necesidades de energía corporal durante 12 horas. En cambio, la cantidad total de triacilglicerol almacenado en un hombre medio de 70 kg es de unos 15 kg, suficiente para cubrir sus necesidades energéticas basales durante 12 semanas (véase la Tabla 23-6). Los triacilgliceroles tienen el contenido energético más alto de todos los nutrientes almacenados (más de 38 kJ/g). Cuando la cantidad de glúcidos ingeridos excede la capacidad de almacenamiento de glucógeno por el organismo, el exceso se convierte en triacilgliceroles que se almacenan en el tejido adiposo. Las plantas también producen triacilgliceroles como combustible rico en energía que se almacena principalmente en frutos y semillas.

En los tejidos animales, los triacilgliceroles y los glicerofosfolípidos tales como la fosfatidiletanolamina comparten dos precursores (acil graso-CoA y L-glicerol 3-fosfato) y varios pasos biosintéticos. La casi totalidad del glicerol 3-fosfato procede del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP) generada por acción de la **glicerol 3-fosfato deshidrogenasa** citosólica ligada al NAD; en el hígado y el riñón también se forma una pequeña cantidad de glicerol 3-fosfato a partir del glicerol por acción de la **glicerol quinasa (Fig. 21-17)**. Los otros precursores de los triacilgliceroles son los acil graso-CoA formados a partir de ácidos grasos por **acil-CoA sintetasas**, los mismos enzimas responsables de la activación de los ácidos grasos para la β oxidación (véase la Fig. 17-5).

El primer paso en la biosíntesis de triacilgliceroles es la acilación de los dos grupos hidroxilo libres del L-glicerol 3-fosfato por dos moléculas de acil graso-CoA para dar **diacilglicerol 3-fosfato**, más frecuentemente

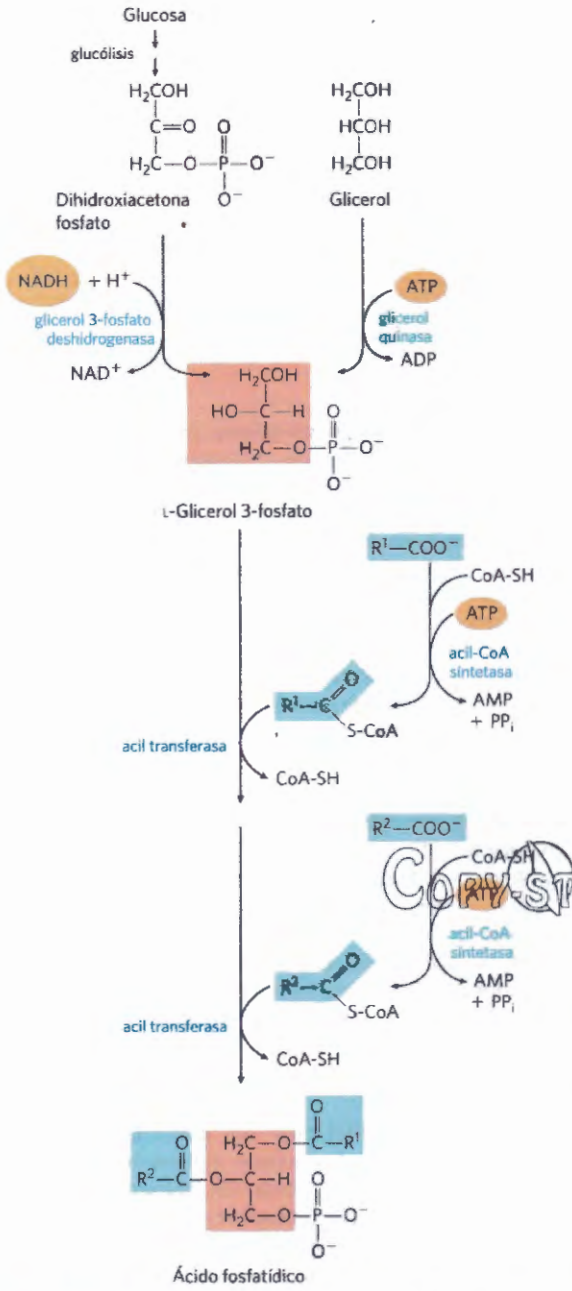


FIGURA 21-17 Biosíntesis del ácido fosfatídico. Se activa un grupo acilo graso mediante formación del acil graso-CoA, que se transfiere a continuación a un enlace éster con el L-glicerol 3-fosfato, formado por cualquiera de las dos vías mostradas. El ácido fosfatídico se muestra aquí con la estereoquímica correcta en el C-2 de la molécula de glicerol. (El producto intermedio con un solo grupo acilo graso esterificado es el ácido lisofosfatídico). Para conservar espacio en las figuras posteriores (también en la Fig. 21-14), los dos grupos acilo graso de los glicerofosfolípidos y los tres grupos acilo de los triacilgliceroles se muestran proyectándose a la derecha.

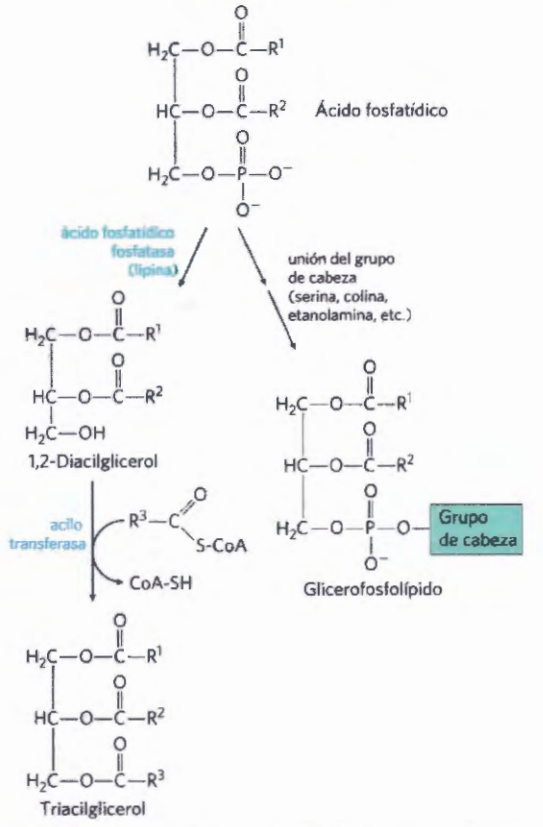


FIGURA 21-18 El ácido fosfatídico en la biosíntesis de lípidos. El ácido fosfatídico es el precursor de los triacilgliceroles y de los glicerofosfolípidos. Los mecanismos de unión del grupo de cabeza en la síntesis de fosfolípidos se describen más adelante en esta sección.

Copy-station

llamado **ácido fosfatídico** o fosfatidato (Fig. 21-17). El ácido fosfatídico se encuentra solamente en cantidades minúsculas en las células, pero es un intermediario crucial en la biosíntesis de lípidos; puede convertirse tanto en triacilglicerol como en glicerofosfolípido. En la ruta de los triacilgliceroles el ácido fosfatídico se hidroliza por la **ácido fosfatídico fosfatasa** (también llamada lipina) y forma un 1,2-diacilglicerol **(Fig. 21-18)**. Los diacilgliceroles se convierten seguidamente en triacilgliceroles por transesterificación con un tercer acil graso-CoA.

La biosíntesis de triacilgliceroles en los animales está regulada por hormonas

En los humanos la cantidad de grasa corporal se mantiene relativamente constante durante largos períodos aunque puede haber cambios a corto plazo poco importantes en función de la fluctuación de la ingestión calórica. Un exceso de consumo de glúcidos, grasas o proteínas por encima de las necesidades energéticas se almacena en forma de triacilgliceroles que pueden ser utilizados para obtener energía permitiéndole al cuerpo soportar períodos de ayuno.

La biosíntesis y degradación de triacilgliceroles están reguladas de manera que la ruta favorecida depende de los recursos metabólicos y de las necesidades del momento. La velocidad de biosíntesis de triacilglicerol se altera profundamente por la acción de varias hormonas. La insulina, por ejemplo, promueve la conversión de glúcidos en triacilgliceroles **(Fig. 21-19)**. Las personas con diabetes mellitus severa, debido a la falta de secreción o de acción de la insulina, no sólo no pueden utilizar adecuadamente la glucosa sino que tampoco pueden sintetizar ácidos grasos a partir de glúcidos o aminoácidos. Si no se trata la diabetes estos indi-

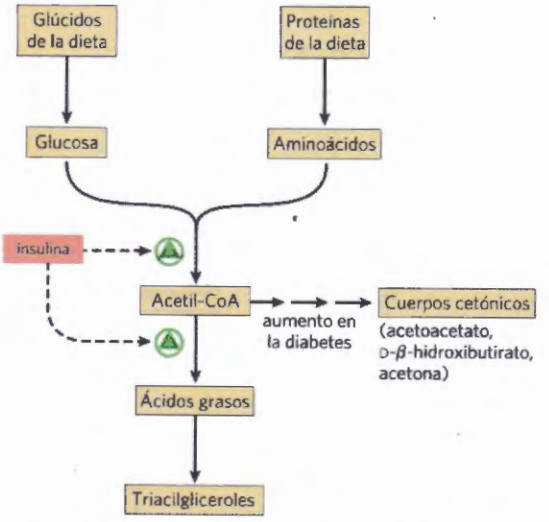


FIGURA 21-19 Regulación de la síntesis de triacilgliceroles por la insulina. La insulina estimula la conversión de los glúcidos y proteínas de la dieta en grasa. Los individuos con diabetes mellitus carecen de insulina o son insensibles a ella; esto provoca una síntesis de ácidos grasos disminuida, y el acetil-CoA procedente del catabolismo de glúcidos y proteínas se desvía hacia la producción de cuerpos cetónicos. Los individuos con cetosis severa huelen a acetona, por lo que este estado se confunde a veces con embriaguez

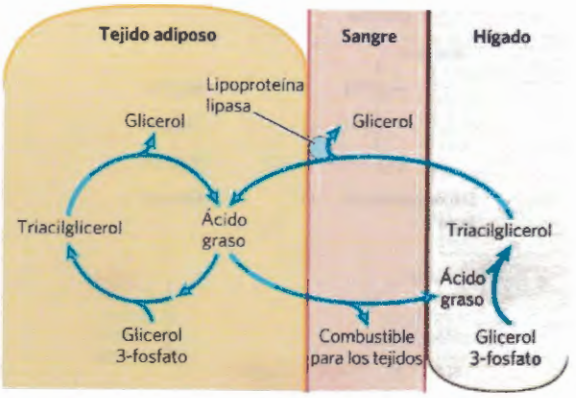


FIGURA 21-20 Ciclo del triacilglicerol. En los mamíferos, las moléculas de triacilglicerol se degradan y resintetizan durante la inanición en un ciclo del triacilglicerol. Algunos de los ácidos grasos liberados por lipólisis del triacilglicerol en el tejido adiposo pasan a la sangre mientras que el resto se utilizan para la resíntesis de triacilgliceroles. Parte de los ácidos grasos liberados a la sangre se utilizan para producir energía (en el músculo, por ejemplo) mientras que otros son captados por el hígado y utilizados en la síntesis de triacilgliceroles. Los triacilgliceroles sintetizados en el hígado se transportan por la sangre nuevamente al tejido adiposo en donde los ácidos grasos son liberados por acción de la lipoproteína lipasa extracelular, captados por los adipocitos y reesterificados en forma de triacilglicerol

viduos presentan un aumento de oxidación de las grasas y de la formación de cuerpos cetónicos (Capítulo 17) y en consecuencia pierden peso. ■

Un factor adicional en el equilibrio entre biosíntesis y degradación de triacilgliceroles es que aproximadamente el 75% de todos los ácidos grasos liberados por lipólisis se reesterifican para formar triacilgliceroles y no para ser utilizados como combustible. Esta proporción se mantiene incluso en condiciones de inanición en las que el metabolismo energético se desvía de la utilización de glúcidos a la oxidación de ácidos grasos. Parte de este reciclado de ácidos grasos tiene lugar en el tejido adiposo y en él la reesterificación tiene lugar antes de la liberación al torrente circulatorio; una parte tiene lugar a través de un ciclo sistémico en el que los ácidos grasos libres se transportan al hígado, se reciclan a triacilglicerol, se exportan de nuevo a la sangre (el transporte de lípidos en la sangre se discute en la Sección 21.4), y son captados de nuevo por el tejido adiposo después de su liberación del triacilglicerol por la lipoproteína lipasa extracelular (**Fig. 21-20**; véase también la Fig. 17-1). El flujo a través de este **ciclo del triacilglicerol** entre tejido adiposo e hígado puede ser muy bajo cuando hay otros combustibles disponibles y la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo es limitada si bien, tal como se mencionó anteriormente, la proporción de ácidos grasos liberados que son reesterificados permanece aproximadamente constante alrededor del 75% en todas las condiciones metabólicas. El nivel de ácidos grasos libres en la sangre revela, por consiguiente, tanto la velocidad de liberación de ácidos grasos como el equilibrio entre la síntesis y la degradación de triacilgliceroles en el tejido adiposo y en el hígado.

Cuando se requiere la movilización de ácidos grasos para afrontar las necesidades energéticas, la liberación del tejido adiposo es estimulada por las hormonas glucagón y adrenalina (véanse las Figs 17-3, 17-13). Simultáneamente, estas señales hormonales disminuyen la velocidad de glucólisis y aumentan la velocidad de gluconeogénesis en el hígado (proporcionando glucosa para el cerebro, tal como se discute más ampliamente en el Capítulo 23). Los ácidos grasos liberados son captados por diversos tejidos, entre ellos el músculo, donde se oxidan para proporcionar energía. Buena parte de los ácidos grasos captados por el hígado no se oxidan sino que se reciclan a triacilglicerol y retornan al tejido adiposo.

La función del ciclo del glicerol, aparentemente inútil (los ciclos de sustrato inútiles se discuten en el Capítulo 15), no está clara. Sin embargo, a medida que conocemos más detalles sobre cómo se mantiene, y se regula de forma coordinada, el ciclo mediante el metabolismo en dos órganos separados, aparecen algunas posibilidades. Por ejemplo, el exceso de capacidad en el ciclo del triacilglicerol (el ácido graso que finalmente se reconvierte en triacilglicerol en lugar de ser oxidado como combustible) podría representar una reserva energética en el torrente circulatorio durante el ayuno, reserva que sería movilizada más rápidamente en una emergencia de "huir o luchar" que la que estaría almacenada en forma de triacilglicerol.

El reciclado constante de triacilgliceroles en el tejido adiposo incluso durante la inanición plantea una segunda cuestión: ¿cuál es la fuente del glicerol 3-fosfato necesario para este proceso? Tal como se dijo antes, la glucólisis está suprimida en estas condiciones por acción del glucagón y la adrenalina, por lo que hay poca DHAP disponible, y el glicerol liberado durante la lipólisis no se puede convertir directamente en glicerol 3-fosfato en el tejido adiposo, ya que esta células carecen de glicerol quinasa (Fig. 21-17). Por tanto, ¿cómo se pro-

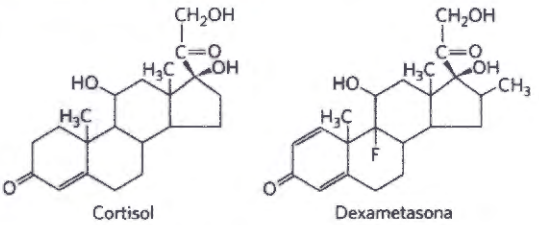
duce glicerol 3-fosfato en cantidad suficiente? La respuesta se encuentra en una ruta descubierta hace más de tres décadas y a la que se ha concedido poca atención hasta hace poco, una ruta unida íntimamente al ciclo del triacilglicerol y, en un sentido más amplio, al equilibrio entre metabolismo de los ácidos grasos y metabolismo glucídico.

El tejido adiposo genera glicerol 3-fosfato mediante gliceroneogénesis

La **gliceroneogénesis** es una versión acortada de la gluconeogénesis, desde el piruvato a DHAP (véase la Fig. 14-17), seguida de la conversión de la DHAP en glicerol 3-fosfato por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica ligada a NAD **(Fig. 21-21)**. A continuación se utiliza el glicerol 3-fosfato en la síntesis de triacilgliceroles. La gliceroneogénesis se descubrió en la década de 1960 por Lea Reshef, Richard Hanson y John Ballard y, simultáneamente, por Eleazar Shafrir y colaboradores, intrigados por la presencia de dos enzimas gluconeogénicos, la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa, en el tejido adiposo, tejido en el que no se sintetiza glucosa. Después de un largo período de ostracismo, se ha renovado el interés en esta vía gracias a la demostración de una conexión entre la gliceroneogénesis y la diabetes tipo , tal como veremos.

La gliceroneogénesis juega muchos papeles. En el tejido adiposo, la gliceroneogénesis acoplada a la reesterificación de ácidos grasos libres, controla la velocidad de liberación de ácidos grasos a la sangre. En el tejido adiposo marrón, la misma ruta puede controlar la velocidad a la que se transfieren ácidos grasos libres a la mitocondria para su uso en la termogénesis. Finalmente, en los individuos humanos en ayunas la gliceroneogénesis sólo en el hígado sostiene la síntesis de suficiente glicerol 3-fosfato para poder justificar hasta el 65% de los ácidos grasos reesterificados a triacilglicerol.

El flujo a través del ciclo del triacilglicerol entre el hígado y el tejido adiposo está controlado en gran parte por la actividad de la PEP carboxiquinasa, que limita la velocidad tanto de la gluconeogénesis como la de la gliceroneogénesis. Hormonas glucocoticoides tales como el cortisol (un esteroide biológico derivado del colesterol; véase la Fig. 21-48) y la dexametasona (un glucocorticoide sintético) regulan recíprocamente los niveles de PEP carboxiquinasa en el hígado y en el tejido adiposo. Actuando a través del receptor de glucocorticoides, estas hormonas esteroideas aumentan la expresión del gen que codifica la PEP carboxiquinasa en el hígado, aumentando así la gluconeogénesis y la gliceroneogénesis **(Fig. 21-22)**.



La estimulación de la gliceroneogénesis conduce a un aumento en la síntesis de moléculas de triacilglicerol en el hígado y su liberación a la sangre. Al mismo tiempo, los glucocorticoides suprimen la expresión del gen que codifica la PEP carboxiquinasa en el tejido adiposo. Esto da lugar a una disminución de la gliceroneogénesis en el tejido adiposo; el resultado es que disminuye el reciclado de ácidos grasos liberándose más ácidos grasos a la sangre. Así, la regulación de la gliceroneogénesis en el hígado y en el tejido adiposo, afecta al metabolismo lipídico de formas opuestas: una velocidad menor de gliceroneogénesis en el tejido adiposo conduce a una mayor liberación de ácidos grasos (en lugar de reciclarlos), mientras que una velocidad mayor en el hígado lleva a una síntesis y exportación incrementadas de triacilgliceroles. El resultado neto es un aumento del flujo a través del ciclo del triacilglicerol. Cuando los glucocorticoides ya no están presentes, el flujo a través del ciclo disminuye a medida que aumenta la expresión de la PEP carboxiquinasa en el tejido adiposo y disminuye en el hígado.

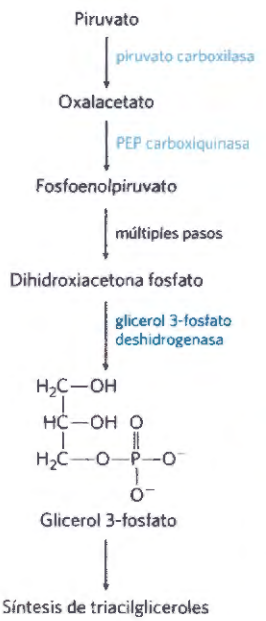


FIGURA 21-21 Gliceroneogénesis. La ruta es esencialmente una versión abreviada de la gluconeogénesis, desde el piruvato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), seguida de conversión de la DHAP en glicerol 3-fosfato, que se utiliza para la síntesis de triacilgliceroles.

Las tiazolidinodionas tratan la diabetes de tipo 2 incrementando la gliceroneogénesis

La atención que se ha prestado recientemente a la gliceroneogénesis, tal como se ha dicho, se debe, en parte, a la conexión entre esta ruta y la diabetes. Niveles elevados de ácidos grasos libres en la sangre interfieren con la utilización de la glucosa en el músculo y promueven la resistencia a la insulina que desemboca en la diabetes tipo 2. Se ha demostrado que una nueva clase de medicamentos denominados **tiazolidinodionas** reduce los niveles de ácidos grasos que circulan en la sangre al tiempo que aumentan la sensibilidad a la insulina. Las tiazolidinodionas promueven la inducción de PEP carboxiquinasa en el tejido adiposo (Fig. 21-22), lo que lleva a un incremento en la síntesis de los precursores de la gliceroneogénesis. El efecto terapéutico de la tiazolidinodionas se debe pues, al menos en parte, al aumento de la gliceroneogénesis que, a su vez, aumenta la resíntesis de triacilglicerol en el tejido adiposo y reduce la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo a la sangre.

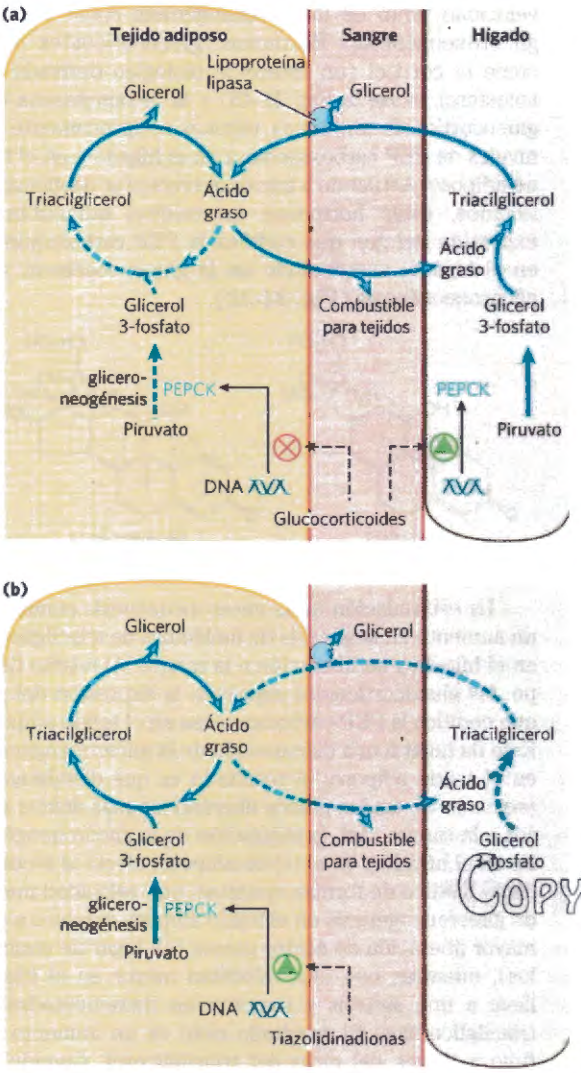


FIGURA 21-22 Regulación de la gliceroneogénesis. (a) Las hormonas glucocorticoides estimulan la gliceroneogénesis y la gluconeogénesis en el hígado, mientras que suprimen la gliceroneogénesis en el tejido adiposo (por regulación recíproca de los genes que expresan la PEP carboxiquinasa (PEPCK) en los dos tejidos); esto aumenta el flujo a través del ciclo del triacilglicerol. El glicerol liberado por la degradación del triacilglicerol en el tejido adiposo pasa a la sangre y se transporta al hígado en donde se convierte mayoritariamente en glucosa, aunque una parte se convierte en glicerol 3-fosfato por la glicerol quinasa. **(b)** Actualmente se utiliza un tipo de fármacos denominados tiazolidinadionas para tratar la diabetes de tipo 2. En esta enfermedad, niveles elevados de ácidos grasos en la sangre interfieren con la utilización de la glucosa en el músculo y promueven la resistencia a la insulina. Las tiazolidinadionas activan un receptor nuclear denominado receptor γ de los peroxisomas activado por proliferadores (PPARγ), que induce la actividad de la PEP carboxiquinasa. Terapéuticamente, las tiazolidinadionas aumentan la velocidad de la gliceroneogénesis con lo que aumentan la resíntesis de triacilgliceroles en el tejido adiposo y reducen la cantidad de ácidos grasos libres en la sangre.

RESUMEN 21.2 Biosíntesis de triacilgliceroles

■ Los triacilgliceroles se forman por la reacción de dos moléculas de acil graso-CoA con glicerol 3-fosfato que dan lugar a ácido fosfatídico; este producto se desfosforila dando un diacilglicerol y a continuación se acila con una tercera molécula de acil graso-CoA que forma un triacilglicerol.

■ La síntesis y degradación de triacilglicerol están reguladas por hormonas.

■ La movilización y el reciclado de las moléculas de triacilglicerol dan lugar a un ciclo del triacilglicerol. Los triacilgliceroles se resintetizan a partir de ácidos grasos libres y glicerol 3-fosfato incluso durante la inanición. La dihidoxiacetona fosfato, precursor del glicerol 3-fosfato procede del piruvato vía gliceroneogénesis.

21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana

En el capítulo 10 introdujimos dos clases importantes de fosfolípidos de membrana: los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. Se pueden formar muchas especies de fosfolípidos diferentes al combinar diversos ácidos grasos y grupos de cabeza polares con los armazones del glicerol o la esfingosina (véase las Figs. 10-8, 10-12). Todas las rutas biosintéticas siguen unos pocos patrones básicos. En general, la formación de fosfolípidos a partir de precursores sencillos requiere: (1) la síntesis del de la molécula armazón (glicerol o esfingosina); (2) unión del ácido(s) graso(s) al armazón en enlace éster o amida; (3) la adición de un grupo de cabeza hidrofílico unido al armazón mediante un enlace fosfodiéster; y, en algunos casos (4) alteración o intercambio del grupo de cabeza para obtener el fosfolípido final.

En las células eucarióticas la síntesis de fosfolípidos tiene lugar principalmente en la superficie del RE liso y en la membrana mitocondrial interna. Algunos fosfolípidos recién sintetizados permanecen en el sitio de síntesis, pero la mayoría son destinados a otras localizaciones celulares. El proceso mediante el cual los fosfolípidos insolubles en agua se desplazan desde el sitio de su síntesis hasta el punto donde finalmente realizarán su función no se conoce con exactitud, aunque discutiremos algunos mecanismos que han aparecido en los últimos años.

Copy-Station

Las células tienen dos estrategias para unir los grupos de cabeza de los fosfolípidos

Los primeros pasos en la síntesis de los glicerofosfolípidos están compartidos con la ruta de los triacilgliceroles (Fig. 21-17): dos grupos acilo graso se esterifican con C-1 y C-2 del L-glicerol 3-fosfato para dar ácido fosfatídico. Frecuentemente, pero no de modo invariable, el ácido graso en la posición C-1 es saturado mientras que el de C-2 es insaturado. Una segunda ruta hacia el ácido fosfatídico es la fosforilación de un diacilglicerol por una quinasa específica.

El grupo polar de cabeza de los glicerofosfolípidos está unido mediante un enlace fosfodiéster, en el que cada uno de los dos hidroxilos alcohólicos (uno en el grupo polar de cabeza y el otro en el C-3 del glicerol) forman un éster con el ácido fosfórico **(Fig. 21-23)**. En el proceso de biosíntesis uno de los hidroxilos es activado primero por la unión de un nucleótido, la citidina difosfato. Seguidamente, se desplaza la citidina monofosfato mediante un ataque nucleofílico por el otro hidroxilo **(Fig. 21-24)**. El CDP se puede unir bien al

diacilglicerol, formando el ácido fosfatídico activado **CDP-diacilglicerol** (estrategia 1), o bien al hidroxilo del grupo de cabeza (estrategia 2). Las células eucarióticas emplean ambas estrategias, mientras que las bacterias sólo utilizan la primera. La importancia central de los nucleótidos de citidina en la biosíntesis de lípidos fue descubierta por Eugene P. Kennedy a principio de la década de 1960 por lo que esta ruta se conoce habitualmente como ruta de Kennedy.

La síntesis de fosfolípidos en *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol

La primera estrategia para la unión de grupos de cabeza se ilustra mediante la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol en *E. coli*. El diacilglicerol se activa por condensación del ácido fosfatídico con CTP y forma CDP-diacilglicerol con eliminación de pirofosfato **(Fig. 21-25)**. El desplazamiento de CMP mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina o del hidroxilo C-1 del glicerol 3-fosfato da lugar a la **fosfatidilserina** o al fosfatidilglicerol 3-fosfato, respectivamente. Este último es aún modificado mediante rotura del monoéster fosfato (con liberación de P_i) y se forma el **fosfatidilglicerol**.



Eugene P. Kennedy, 1919–2011 [Fuente: Cortesía de EPK Family.]

Tanto la fosfatidilserina como el fosfatidilglicerol pueden actuar como precursores de otros lípidos de membrana en bacterias (Fig. 21-25). La descarboxilación de la porción serina de la fosfatidilserina por la fosfatidilserina descarboxilasa produce **fosfatidiletanolamina**. En *E. coli* la condensación de dos moléculas de fosfatidilglicerol, con la eliminación de una de glicerol, forma **cardiolipina**, en la que se unen dos diacilgliceroles a través de un grupo de cabeza común.

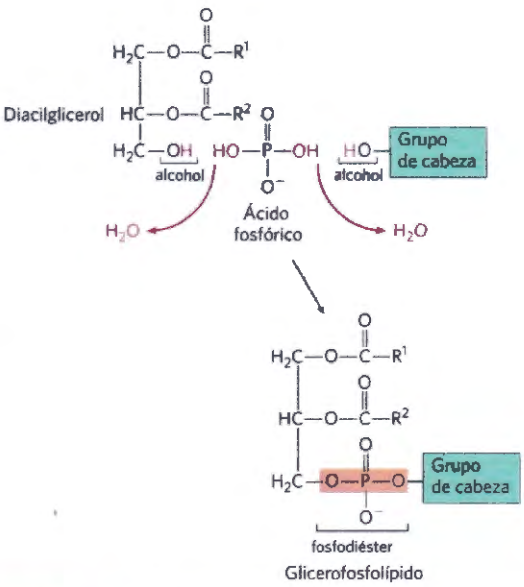


FIGURA 21-23 Unión del grupo de cabeza. El grupo de cabeza del fosfolípido se une al diacilglicerol mediante un enlace fosfodiéster (sombreado en rojo claro), formado cuando el ácido fosfórico se condensa con dos alcoholes, eliminando dos moléculas de H_2O.

COPYSTATION

Los eucariotas sintetizan fosfolípidos aniónicos a partir del CDP-diacilglicerol

En los eucariotas el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y los fosfatidilinositoles (todos ellos fosfolípidos aniónicos; véase la Fig. 10-8) se sintetizan con la misma estra-

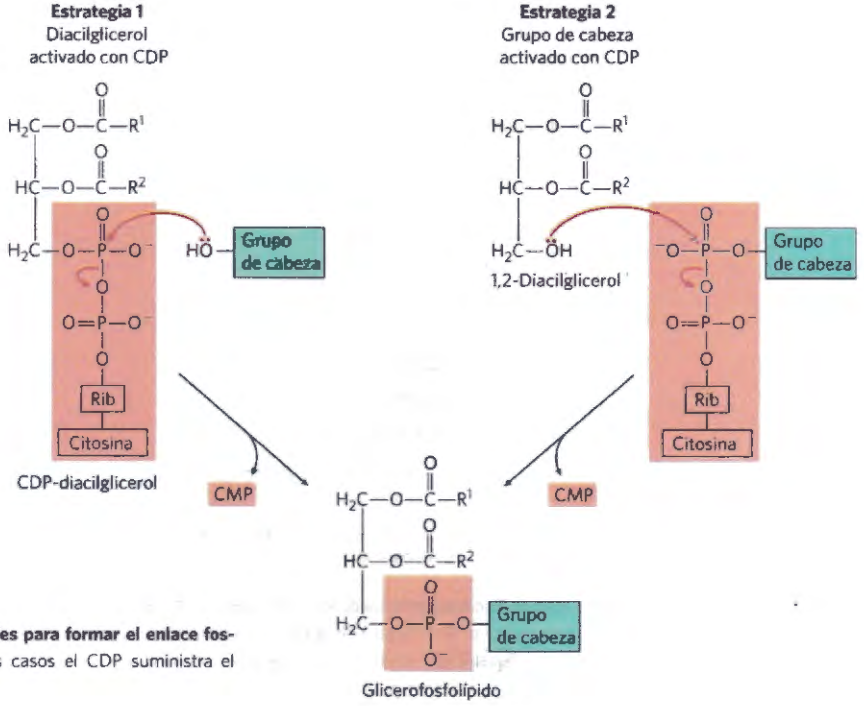
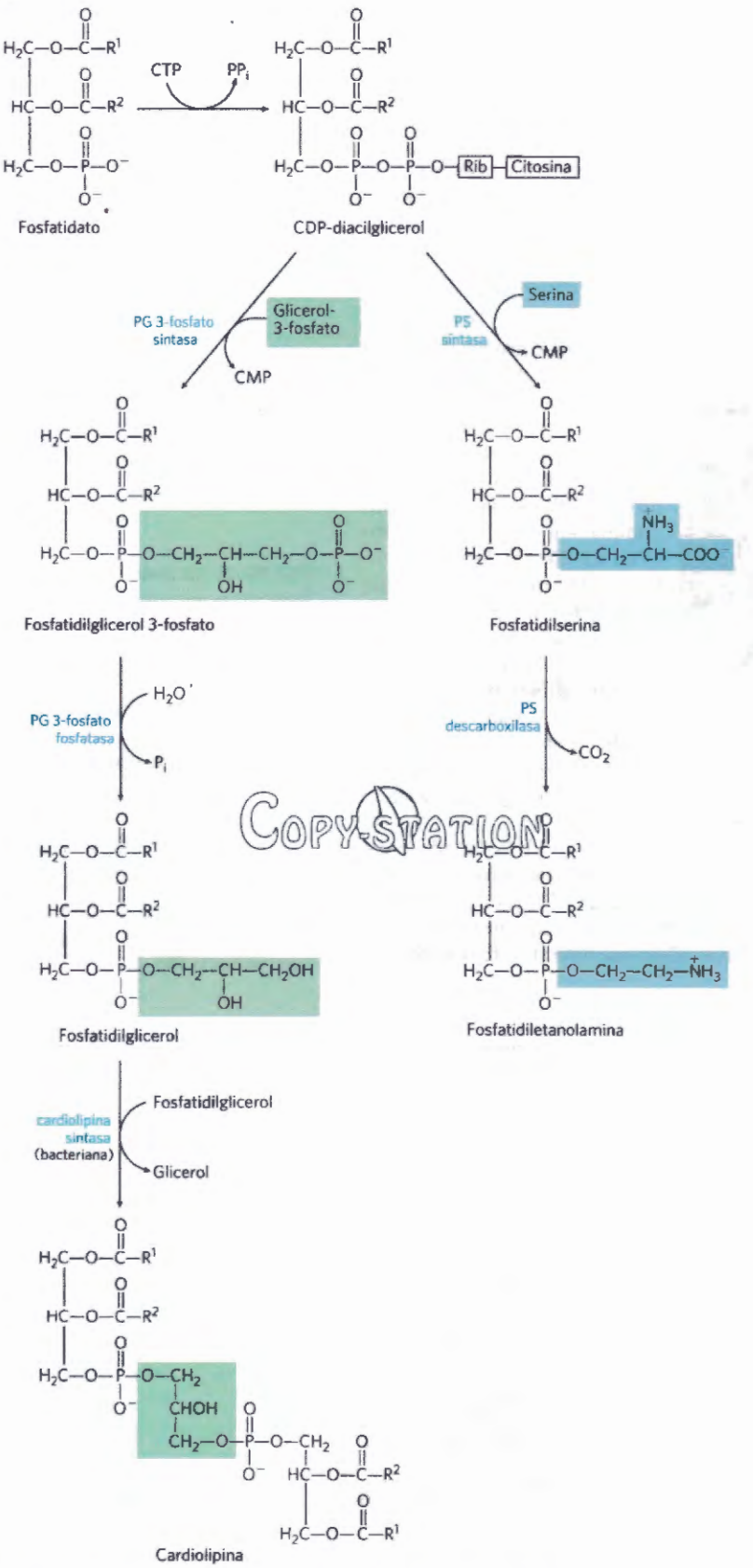


FIGURA 21-24 Dos estrategias generales para formar el enlace fosfodiéster de los fosfolípidos. En los dos casos el CDP suministra el grupo fosfato del enlace fosfodiéster.



COPY-STATION

FIGURA 21-25 Origen de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos en *E. coli*. Inicialmente se une un grupo polar (serina o glicerol 3-fosfato) a través de un intermediario CDP-diacilglicerol (estrategia 1 en la Fig. 21-24). En otros fosfolípidos diferentes de la fosfatidilserina el grupo de cabeza se modifica posteriormente, tal como se muestra aquí. En los nombres de los enzimas PG representa fosfatidilglicerol y PS, fosfatidilserina.

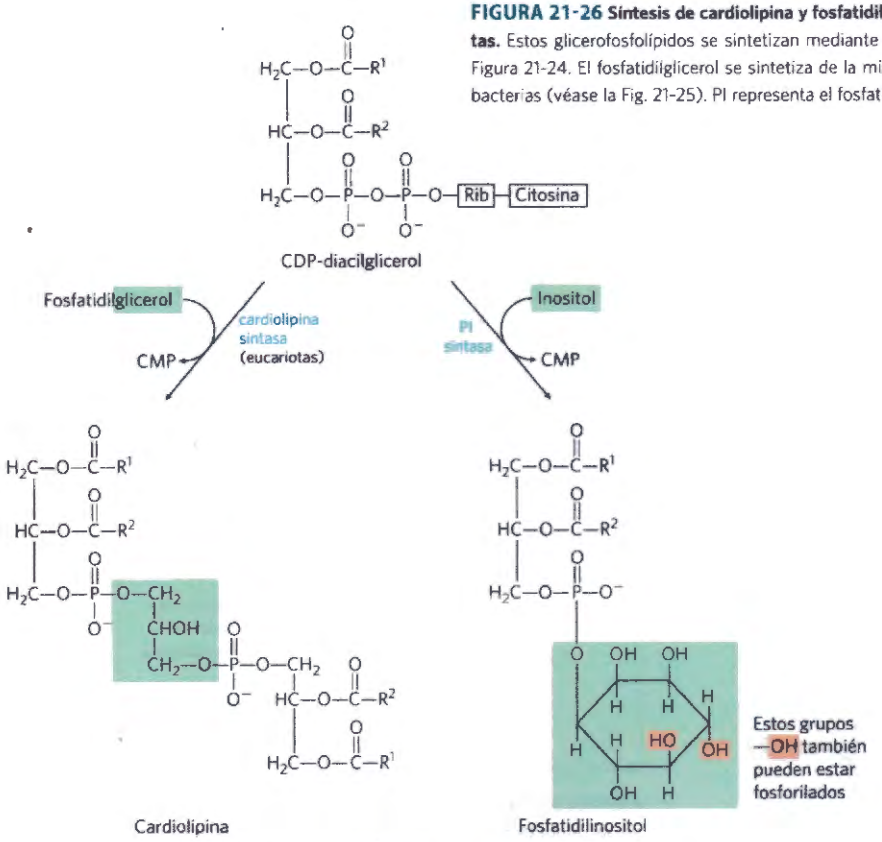


FIGURA 21-26 Síntesis de cardiolipina y fosfatidilinositol en eucariotas. Estos glicerofosfolípidos se sintetizan mediante la estrategia 1 de la Figura 21-24. El fosfatidilglicerol se sintetiza de la misma manera que en bacterias (véase la Fig. 21-25). PI representa el fosfatidilinositol.

COPY-STATION

tegia utilizada para la síntesis de fosfolípidos en bacterias. El fosfatidilglicerol se forma exactamente igual que en las bacterias. La síntesis de cardiolipina en eucariotas difiere ligeramente: el fosfatidilglicerol se condensa con CDP-diacilglicerol **(Fig. 21-26)**, en lugar de con otra molécula de fosfatidilglicerol como en *E. coli* (Fig. 21-25).

El fosfatidilinositol se sintetiza por condensación del CDP-diacilglicerol con el inositol (Fig. 21-26). **Fosfatidilinositol quinasas** específicas convierten a continuación el fosfatidilinositol en sus derivados fosforilados. El fosfatidilinositol y sus productos fosforilados de la membrana plasmática juegan un papel central en la transducción de señal en eucariotas, (véanse las Figs. 12-10, 12-11, 12-20).

Las rutas eucarióticas hasta la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina están interrelacionadas

La levadura, al igual que las bacterias, puede producir fosfatidilserina por condensación del CDP-diacilglicerol con serina, y puede sintetizar fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina en la reacción catalizada por la fosfatidilserina descarboxilasa **(Fig. 21-27)**. La fosfatidiletanolamina se puede convertir en **fosfatidilcolina** (lecitina) por la adición de tres grupos metilo a su grupo amino. La *S*-adenosilmetionina es el dador de grupo metilo (véase la Fig. 18-18) en las tres reacciones de metilación. Las rutas que conducen a la fosfatidilcolina y a la fosfatidiletanolamina en levadura se resumen en la **Figura 21-28**. Estas rutas constituyen las fuentes principales de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en todas las células eucarióticas.

En los mamíferos la fosfatidilserina no se sintetiza a partir del CDP-diacilglicerol sino que proviene de la fosfatidiletanolamina o de la fosfatidilcolina mediante una, de entre dos posibles, reacciones de intercambio del grupo de cabeza que tienen lugar en el retículo endoplasmático **(Fig. 21-29a)**. La síntesis de la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina en los mamíferos tiene lugar según la estrategia 2 de la Figura 21-24: fosforilación y activación del grupo de cabeza seguido por condensación con diacilglicerol. Por ejemplo, la colina se reutiliza ("recupera") al ser fosforilada para luego convertirse en CDP-colina por condensación con CTP. Un diacilglicerol desplaza CMP de la CDP-colina produciendo fosfatidilcolina (Fig. 21-29b). Una ruta de recuperación análoga convierte la etanolamina obtenida de la dieta en fosfatidiletanolamina. En el hígado la fosfatidilcolina se produce también por metilación de la fosfatidiletanolamina (con *S*-adenosilmetionina, como se ha descrito anteriormente), pero en el resto de tejidos la fosfatidilcolina se produce sólo por condensación del diacilglicerol con CDP-colina.

La síntesis de plasmalógeno requiere la formación de un alcohol graso unido por enlace éter

En la ruta biosintética que conduce a lípidos con función éter, entre ellos los **plasmalógenos** y el **factor activador plaquetario** (véase la Fig. 10-9), interviene el desplazamiento de un grupo acilo graso esterificado con un alcohol de cadena larga para formar el enlace

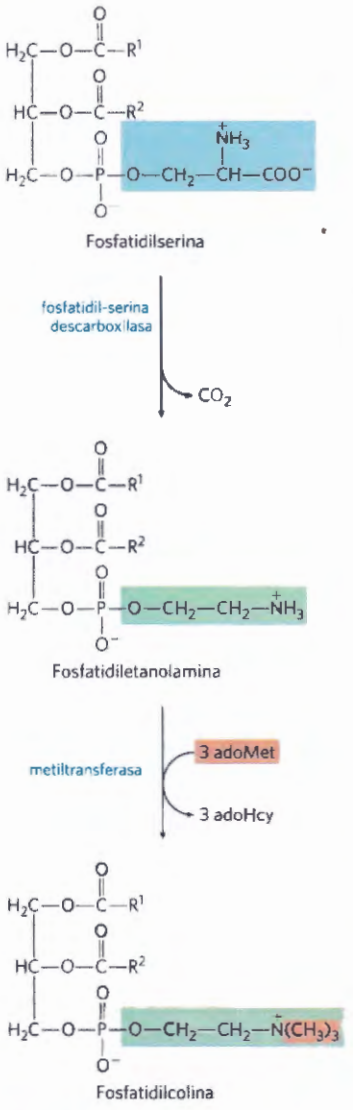


FIGURA 21-27 Ruta principal desde la fosfatidilserina a la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en todos los eucariotas. AdoMet es *S*-adenosilmetionina; adoHcy representa *S*-adenosilhomocisteína.

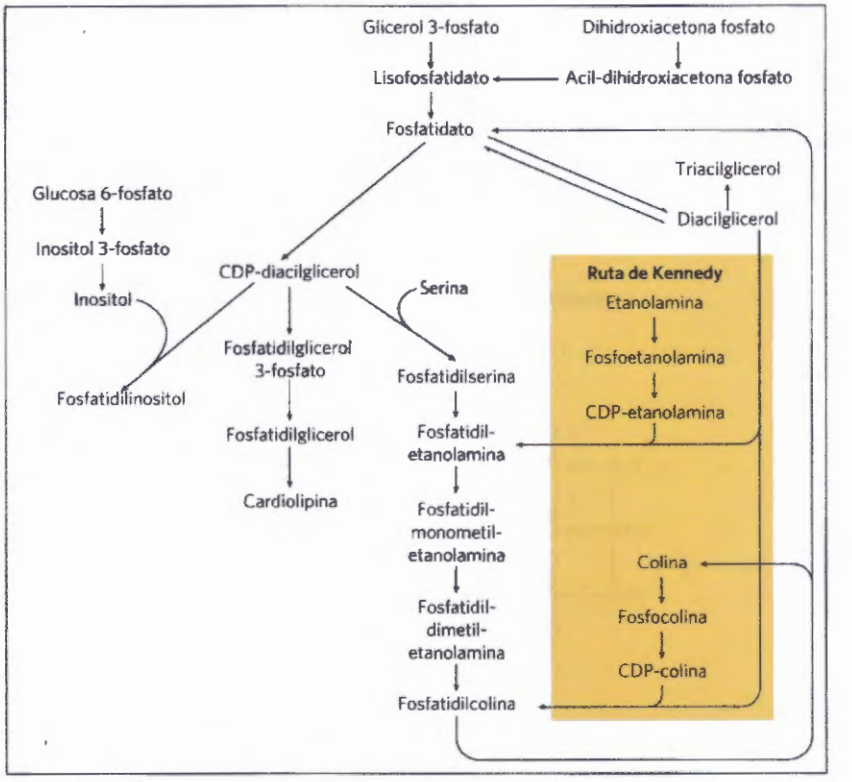


FIGURA 21-28 Resumen de las rutas de síntesis de los principales fosfolípidos y triacilglicéridos en un eucariota (levadura). El ácido fosfatídico se forma por transacilación del L-glicerol 3-fosfato con dos grupos acilo graso cedidos por un acilo graso-CoA. El enzima ácido fosfatídico fosfatasa (lipina) convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol. En la ruta de Kennedy se condensa con un grupo de cabeza activado con CDP-(etanolamina o colina) y forma fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. De manera alternativa, el ácido fosfatídico se puede activar con una porción CDP, que es desplazada por condensación con un grupo alcohol de cabeza (inositol, glicerol 3-fosfato o serina) formando fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol o fosfatidilserina. La descarboxilación de la fosfatidilserina da fosfatidiletanolamina y la metilación de la fosfatidiletanolamina produce fosfatidilcolina. No se muestran aquí las reacciones de intercambio de grupo de cabeza (véase la Fig. 21-29a) que interconvierte fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina en mamíferos. El ácido lisofosfatídico es el ácido fosfatídico al que le faltan uno o dos grupos acilo. [Fuente: Información de G. M. Carman y G.-S. Han, *Annu. Rev. Biochem.* 80:859, 2011, Fig. 2.]

éter **(Fig. 21-30)**. A continuación tiene lugar la unión del grupo de cabeza por mecanismos esencialmente iguales a los utilizados en la formación de los fosfolípidos comunes unidos por enlace éster. Finalmente, el doble enlace característico de los plasmalógenos (sombreado en azul en la Fig. 21-30) es introducido por la acción de una oxidasa de función mixta similar a la responsable de la desaturación de los ácidos grasos (Fig. 21-13). El peroxisoma es el sitio principal de la síntesis de plasmalógenos.

Las síntesis de esfingolípidos y glicerofosfolípidos comparten precursores y algunos mecanismos

La biosíntesis de esfingolípidos tiene lugar en cuatro fases: (1) síntesis de la amina de 18 carbonos **esfinganina** a partir del palmitil-CoA y serina; (2) unión de un ácido graso en enlace amida para formar ***N*-acilesfinganina**; (3) desaturación de la porción de esfinganina para formar ***N*-acilesfingosina** (ceramida); y (4) unión de un grupo de cabeza para producir un esfingolípido tal como un **cerebrósido** o **esfingomielina (Fig. 21-31)**. Los primeros pasos de esta ruta tienen lugar en el retículo endoplasmático, mientras que la unión de los grupos de cabeza en el paso 4 tiene lugar en el complejo de Golgi. La ruta comparte algunas características con las rutas que conducen a los glicerofosfolípidos: el NADPH proporciona el poder reductor y los ácidos grasos entran en forma de sus derivados de CoA activados. En la formación de cerebrósidos los azúcares entran en su forma activada de derivados de nucleótidos. La unión del grupo de cabeza en la síntesis de esfingolípidos tiene varios aspectos novedosos. La fosfatidilcolina, en lugar de la CDP-colina, es el dador de fosfocolina en la síntesis de esfingomielina.

En los glucolípidos, cerebrósidos y **gangliósidos** (véase la Fig. 10-12), el grupo de cabeza es un azúcar unido directamente al hidroxilo C-1 de la esfingosina mediante un enlace glucosídico, en lugar de un enlace fosfodiéster; el dador del azúcar es un UDP-azúcar (UDP-glucosa o UDP-galactosa).

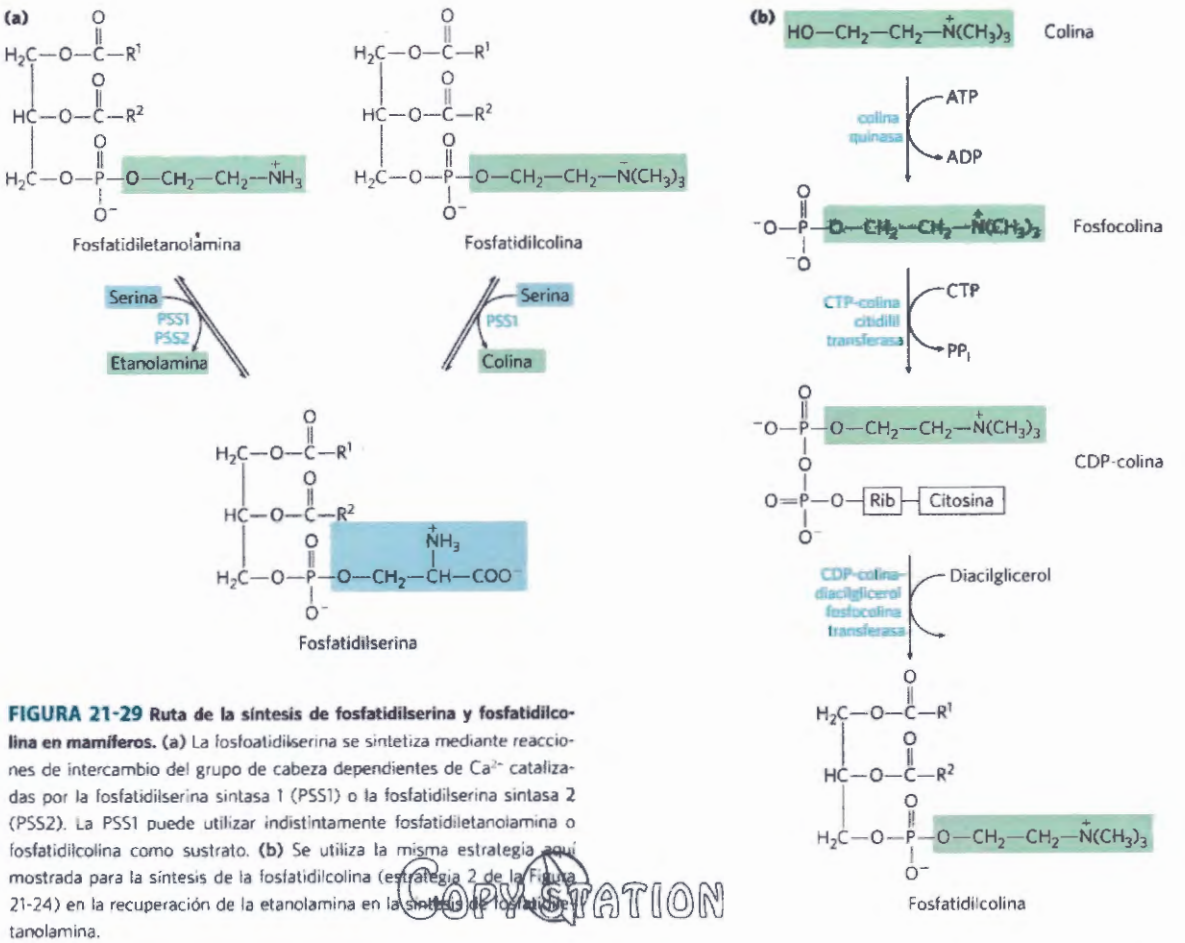


FIGURA 21-29 Ruta de la síntesis de fosfatidilserina y fosfatidilcolina en mamíferos. (a) La fosfoatidilserina se sintetiza mediante reacciones de intercambio del grupo de cabeza dependientes de Ca^{2+} catalizadas por la fosfatidilserina sintasa 1 (PSS1) o la fosfatidilserina sintasa 2 (PSS2). La PSS1 puede utilizar indistintamente fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina como sustrato. **(b)** Se utiliza la misma estrategia aquí mostrada para la síntesis de la fosfatidilcolina (estrategia 2 de la Figura 21-24) en la recuperación de la etanolamina en la síntesis de fosfatidiletanolamina.

COPYSTATION

Los lípidos polares están destinados a membranas celulares específicas

Después de su síntesis en el RE liso los lípidos polares, entre ellos los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y glucolípidos, se insertan en membranas celulares específicas en proporciones específicas mediante mecanismos todavía no bien conocidos. Los lípidos de membrana son insolubles en agua, por lo que no pueden difundir simplemente desde su sitio de síntesis (el RE) hasta su lugar de inserción. En lugar de ello, se transportan desde el RE al complejo de Golgi en donde también puede tener lugar síntesis adicional. A continuación son transferidos en vesículas membranosas que brotan por gemación del complejo de Golgi para seguidamente trasladarse y fundirse con las membranas diana. Proteínas de transferencia de esfingolípidos transportan la ceramida desde el RE al complejo de Golgi en donde tiene lugar la síntesis de esfingomielina. También hay proteínas citosólicas que unen fosfolípidos y esteroles transportándolos de una membrana celular a otra. Estos mecanismos contribuyen a establecer la composición lipídica característica de la membrana de cada orgánulo (véase la Fig. 11-2).

RESUMEN 21.3 Biosíntesis de fosfolípidos de membrana

- Los diacilgliceroles son los principales precursores de los glicerofosfolípidos.
- En las bacterias, la fosfatidilserina se forma por condensación de la serina con CDP-diacilglicerol; la descarboxilación de la fosfatidilserina produce fosfatidiletanolamina. El fosfatidilglicerol se forma por condensación del CDP-diacilglicerol con glicerol 3-fosfato seguida de la eliminación del fosfato en enlace monoéster.
- Las levaduras utilizan rutas similares a las de las bacterias en la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol; la fosfatidilcolina se forma por metilación de la fosfatidiletanolamina.
- Las células de mamíferos tienen algunas rutas a las de las bacterias, pero las de la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son algo diferentes. El grupo alcohol de cabeza (colina o etanolamina) se activa en forma de derivado CDP y, a continuación, se condensa con diacilglicerol. La fosfatidilserina sólo proviene de la fosfatidiletanolamina.
- El doble enlace característico de los plasmalógenos es introducido por una oxidasa de función mixta. Los grupos de cabeza de los esfingolípidos se unen mediante mecanismos característicos.
- Los fosfolípidos se trasladan a sus destinos intracelulares mediante vesículas de transporte o proteínas específicas.

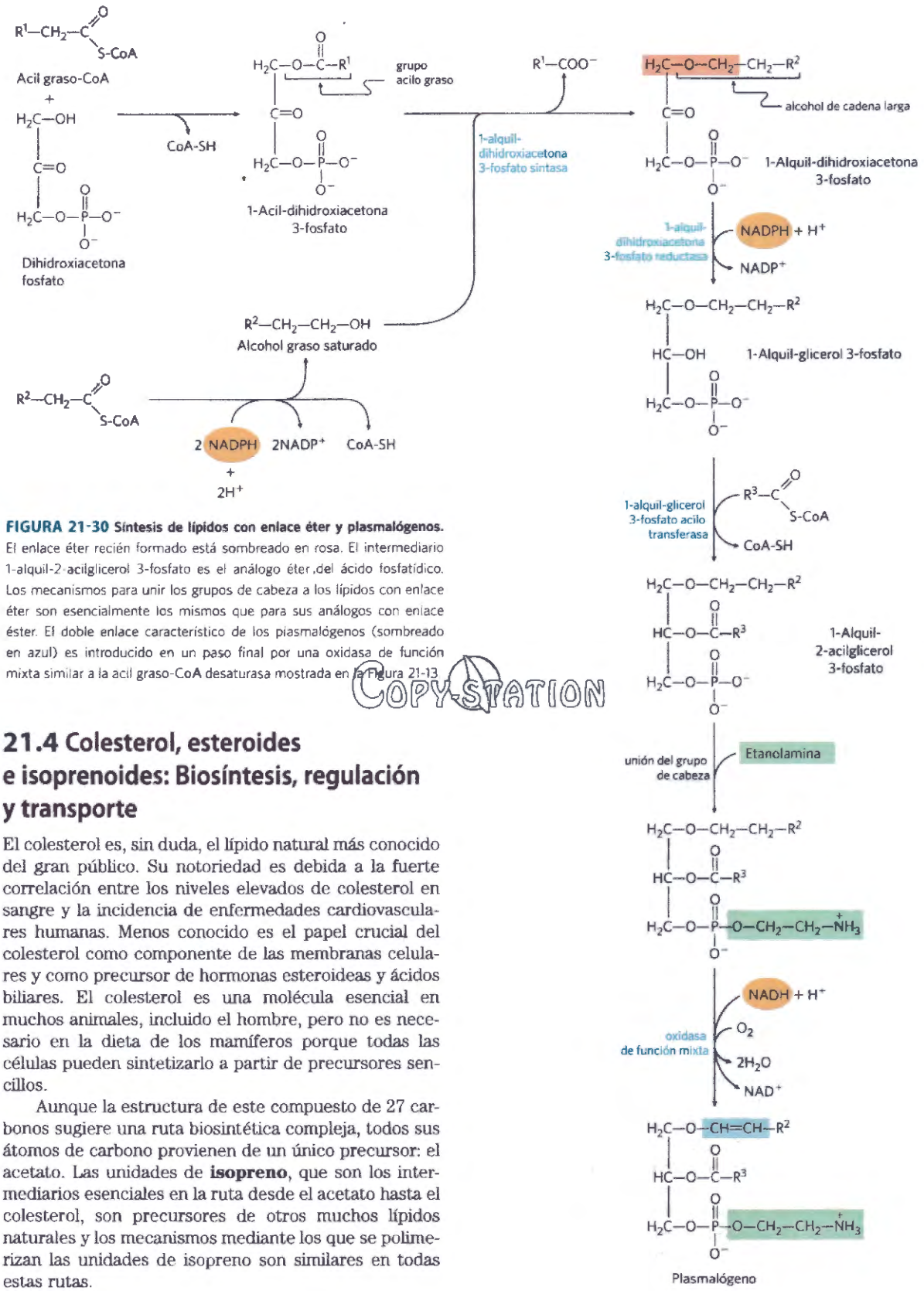


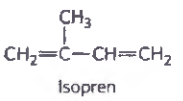
FIGURA 21-30 Síntesis de lípidos con enlace éter y plasmalógenos. El enlace éter recién formado está sombreado en rosa. El intermediario 1-alquil-2-acilglicerol 3-fosfato es el análogo éter del ácido fosfatídico. Los mecanismos para unir los grupos de cabeza a los lípidos con enlace éter son esencialmente los mismos que para sus análogos con enlace éster. El doble enlace característico de los plasmalógenos (sombreado en azul) es introducido en un paso final por una oxidasa de función mixta similar a la acil graso-CoA desaturasa mostrada en la Figura 21-13.

COPY-STATION

21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: Biosíntesis, regulación y transporte

El colesterol es, sin duda, el lípido natural más conocido del gran público. Su notoriedad es debida a la fuerte correlación entre los niveles elevados de colesterol en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares humanas. Menos conocido es el papel crucial del colesterol como componente de las membranas celulares y como precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares. El colesterol es una molécula esencial en muchos animales, incluido el hombre, pero no es necesario en la dieta de los mamíferos porque todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores sencillos.

Aunque la estructura de este compuesto de 27 carbonos sugiere una ruta biosintética compleja, todos sus átomos de carbono provienen de un único precursor: el acetato. Las unidades de **isopreno**, que son los intermediarios esenciales en la ruta desde el acetato hasta el colesterol, son precursores de otros muchos lípidos naturales y los mecanismos mediante los que se polimerizan las unidades de isopreno son similares en todas estas rutas.



Isopren

Comenzaremos con una descripción de las principales etapas en la biosíntesis del colesterol a partir del acetato y, a continuación, discutiremos el transporte

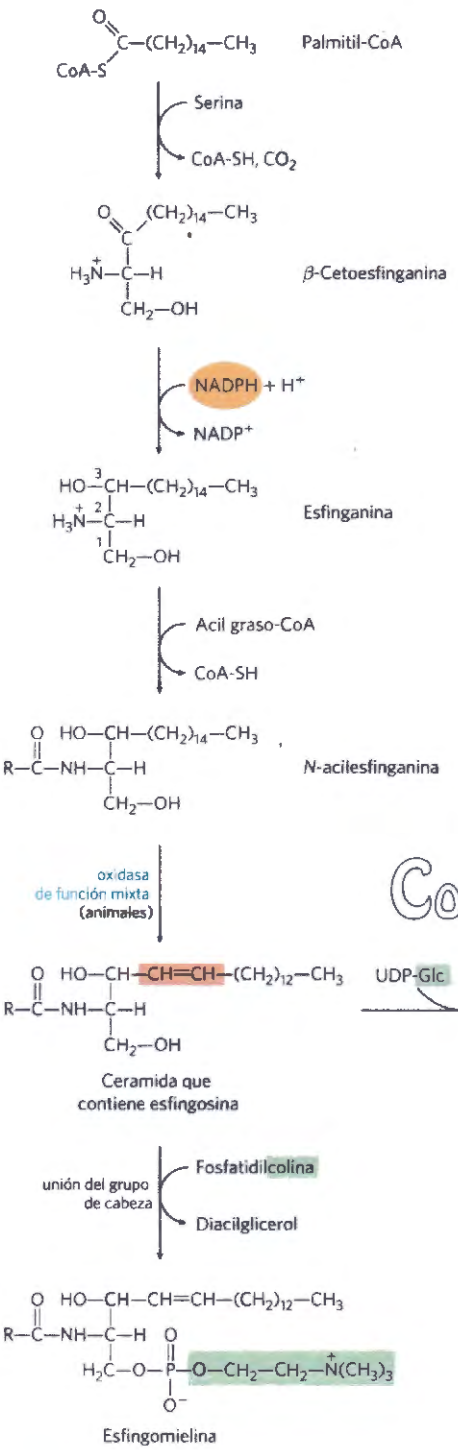


FIGURA 21-31 Biosíntesis de esfingolípidos. La condensación del palmitil-CoA y serina, formando β-cetoesfinganina, seguida por la reducción con NADPH da lugar a la esfinganina, que se acila dando *N*-acilesfinganina (una ceramida). En los animales se crea un doble enlace (sombreado en rosa) por una oxidasa de función mixta, antes de la adición final de un grupo de cabeza: fosfatidilcolina para formar esfingomielina o glucosa para formar un cerebrósido.

del colesterol en la sangre, su captación por las células y la regulación de la síntesis del colesterol en individuos normales y en los que presentan defectos en la captación o transporte del mismo. A continuación consideraremos otros componentes celulares derivados del colesterol tales como los ácidos biliares y las hormonas esteroideas. Finalmente, se presentará un bosquejo de las rutas biosintéticas que conducen a alguno de los muchos compuestos derivados de las unidades de isopreno, que comparten etapas iniciales de la vía del colesterol, con el fin de ilustrar la extraordinaria versatilidad de las condensaciones isoprenoides en biosíntesis.

El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en cuatro fases

El colesterol, al igual que los ácidos grasos de cadena larga, se forma a partir de acetil-CoA, pero el plan de formación es totalmente diferente del de los ácidos grasos de cadena larga. En experimentos iniciales se alimentaron animales con acetato marcado con ^{14}C en el carbono metílico o en el carboxílico. El patrón de marcaje en el colesterol aislado de los dos grupos de animales **(Fig. 21-32)** proporcionó la clave para clarificar los pasos enzimáticos de la biosíntesis del colesterol.

La síntesis tiene lugar en cuatro fases tal como se muestra en la **Figura 21-33**: ❶ tres unidades de acetato se condensan para formar un intermediario de seis átomos de carbono, el mevalonato. ❷ conversión del mevalonato en unidades de isopreno activadas; ❸ polimerización de seis unidades de isopreno de 5 carbonos para dar lugar a la estructura lineal de 30 carbonos del escualeno; y ❹ ciclación del escualeno para formar los cuatro anillos del núcleo esteroide además de una serie de cambios adicionales (oxidaciones, eliminación o migración de grupos metilo) para producir el colesterol.

COPY-STATION

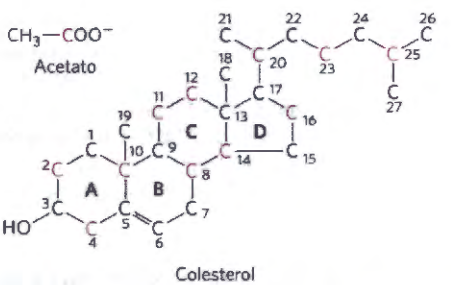


FIGURA 21-32 Origen de los átomos de carbono del colesterol. El origen puede deducirse de experimentos con trazadores utilizando acetato marcado en el carbono metílico (negro) o en el carbono carboxílico (rojo). Los diferentes anillos del sistema anular del colesterol se designan de A a D.

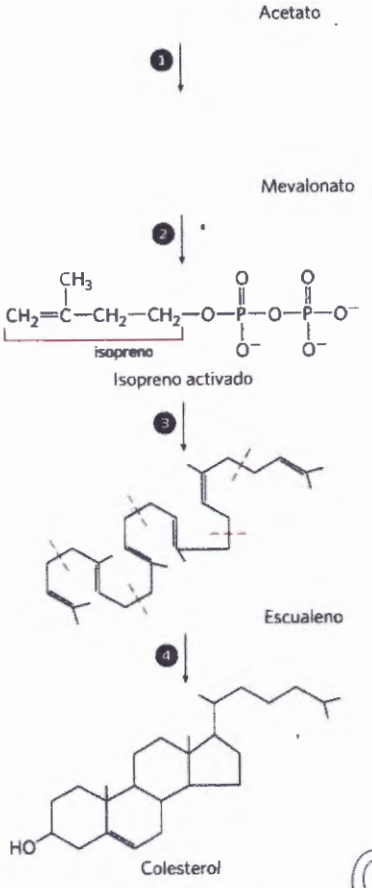


FIGURA 21-33 Resumen de la biosíntesis del colesterol. Las cuatro etapas se discuten en el texto. Las unidades de isopreno en el escualeno están separadas por líneas discontinuas rojas.

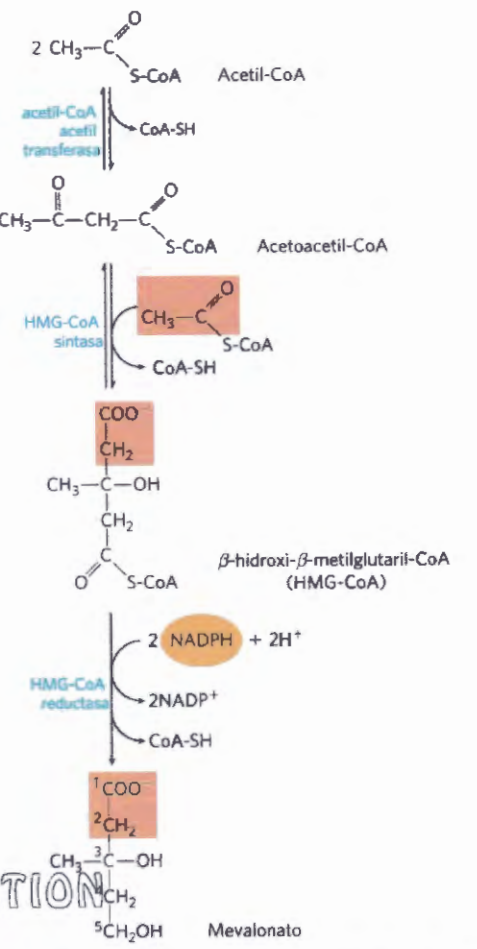


FIGURA 21-34 Formación del mevalonato a partir de acetil-CoA. El origen de C-1 y C-2 del mevalonato a partir del acetil-CoA se muestra en rosa.

Fase 1 Síntesis del mevalonato a partir del acetato La primera fase en la biosíntesis del colesterol lleva al intermedio **mevalonato (Fig. 21-34)**. Dos moléculas de acetil-CoA se condensan formando acetoacetil-CoA, que, a su vez, se condensa con una tercera molécula de acetil-CoA para dar lugar al compuesto de seis carbonos **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA).** Estas dos primeras reacciones están catalizadas por la **acetil-CoA acetil transferasa** y la **HMG-CoA sintasa**, respectivamente. La HMG-CoA sintasa citosólica de esta ruta es diferente al isozima mitocondrial que cataliza la síntesis de HMG-CoA en la formación de cuerpos cetónicos (véase la Fig. 17-18).

La tercera reacción es el paso de compromiso, limitante de velocidad: la reducción del HMG-CoA a mevalonato, para la cual dos moléculas de NADPH ceden dos electrones cada una. La **HMG-CoA reductasa,** una proteína integral de membrana del RE liso es, tal como veremos, el punto principal de regulación en la ruta del colesterol.

Fase 2 Conversión del mevalonato en dos isoprenos activados En la siguiente fase se transfieren tres grupos fosfato de tres moléculas de ATP al mevalonato **(Fig. 21-35)**. El fosfato unido al grupo hidroxilo en C-3 del mevalonato del intermedio 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato es un buen grupo saliente; en el paso siguiente salen este fosfato y el grupo carboxilo vecino y se forma un doble enlace en el producto de cinco carbonos **Δ^3-isopentenil pirofosfato.** Éste es el primero de los dos isoprenos activados cruciales en la formación del colesterol. La isomerización del Δ^3-isopentenil pirofosfato da lugar al segundo isopreno activado, el **dimetilalil pirofosfato.** La síntesis de isopentenil pirofosfato en el citoplasma de las células vegetales sigue la misma ruta aquí descrita. Sin embargo, los cloroplastos de las plantas y muchas bacterias utilizan una ruta independiente del mevalonato. Esta ruta alternativa no existe en animales, por lo que es un objetivo interesante para el desarrollo de nuevos antibióticos.

Fase 3 Condensación de seis unidades de isopreno activado para formar escualeno El isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato experimentan una condensación cabeza-cola en la que se desplaza un grupo pirofosfato y se forma una cadena de 10 carbonos, el **geranil pirofosfato (Fig. 21-36)**. (La "cabeza" es el extremo al que está unido el pirofosfato). El geranil pirofosfato experimenta otra condensación cabeza-cola con isopentenil pirofosfato dando el intermediario de 15 carbonos **farnesil pirofosfato.** Finalmente, dos moléculas de farnesil pirofosfato se unen cabeza

COPY-STATION



Konrad Bloch, 1912-2000 [Fuente: AP/Wide World Photos.]



Feodor Lynen, 1911-1979 [Fuente: AP/Wide World Photos.]



John Cornforth, 1917-2013 [Fuente: Bettmann/Corbis.]



George Popják, 1914-1998 [Fuente: Professor George Joseph Popják, MD, DSc, FRS. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:830, 1999. ©1999 Wolters Kluwer Health.]

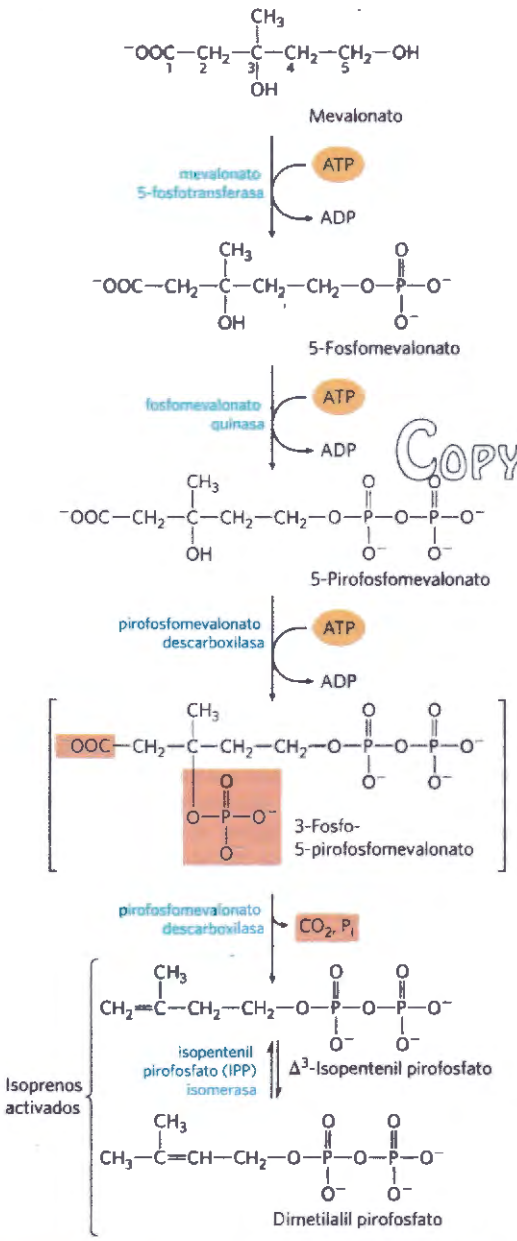


FIGURA 21-35 Conversión del mevalonato en unidades de isopreno activo. Seis de estas unidades activadas se combinan para formar el escualeno (véase la Fig. 21-36). Los grupos salientes del 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato están sombreados en rosa. El intermedio entre corchetes es hipotético

con cabeza, con eliminación de los dos grupos pirofosfato para formar el **escualeno.** El escualeno tiene 30 carbonos, 24 en la cadena principal y 6 en forma de ramificaciones de grupos metilo.

Los nombres comunes de estos intermediarios proceden de las fuentes de las que fueron aislados originalmente. El geraniol, componente del aceite de rosas, tiene el aroma de los geranios, y el farnesol proviene de las flores de la *Acacia farnesiana*. Muchos aromas naturales de origen vegetal se sintetizan a partir de unidades de isopreno. El escualeno, aislado por primera vez del hígado de tiburón (género *Squalus*).

COPY-STATION

Paso ❹ Conversión del escualeno en el núcleo esteroideo de cuatro anillos Cuando se representa la molécula de escualeno en la forma de la **Figura 21-37** es evidente la relación entre su estructura lineal y la estructura cíclica de los esteroles. Todos los esteroles tienen los cuatro anillos fusionados que forman el núcleo esteroide y todos son alcoholes con un grupo hidroxilo en C-3; de ahí el nombre "esterol". Por acción de la **escualeno monooxigenasa** se añade un átomo de oxígeno del O_2 al extremo de la cadena del escualeno, formándose un epóxido. Este enzima es otra oxidasa de función mixta; el NADPH reduce el otro átomo del O_2 a H_2O. Los dobles enlaces del producto, **escualeno 2,3-epóxido,** están colocados de modo que una notable reacción concertada convierte el escualeno epóxido lineal en una estructura cíclica. En las células animales esta ciclación conduce a la formación de **lanosterol**, que contiene los cuatro anillos característicos del núcleo esteroideo. El lanosterol se convierte finalmente en colesterol en una serie de unas 20 reacciones que incluyen la migración de algunos grupos metilo y la eliminación de otros. La dilucidación de esta extraordinaria ruta biosintética, una de las más complejas que se conocen, fue llevada a cabo principalmente por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth y Georges Popják a finales de la década de 1950.

El colesterol es el esterol característico de las células animales; las plantas, hongos y protistas fabrican otros esteroles estrechamente relacionados utilizando la misma ruta biosintética hasta el escualeno-2,3-epóxido. En este punto las rutas divergen ligeramente dando otros esteroles, tales como el estigmasterol en muchas plantas y el ergosterol en los hongos (Fig. 21-37).

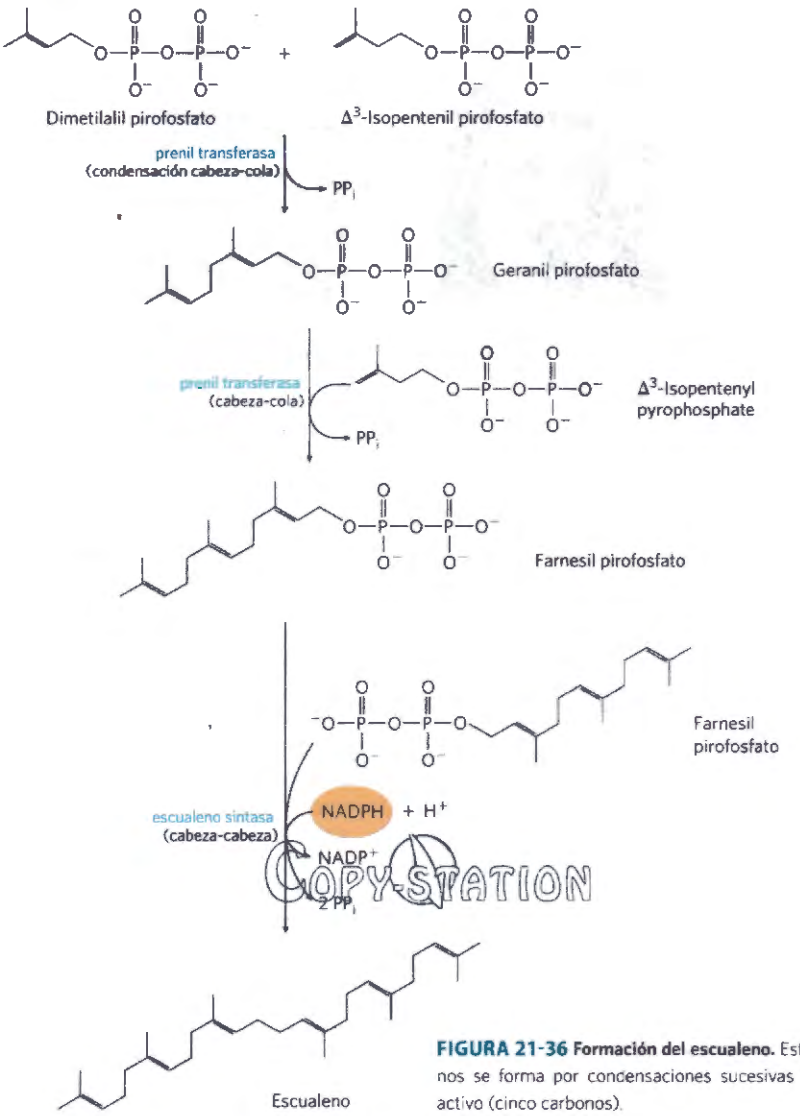


FIGURA 21-36 Formación del escualeno. Esta estructura de 30 carbonos se forma por condensaciones sucesivas de unidades de isopreno activo (cinco carbonos).

EJEMPLO PRÁCTICO 21-1 Coste energético de la síntesis del escualeno

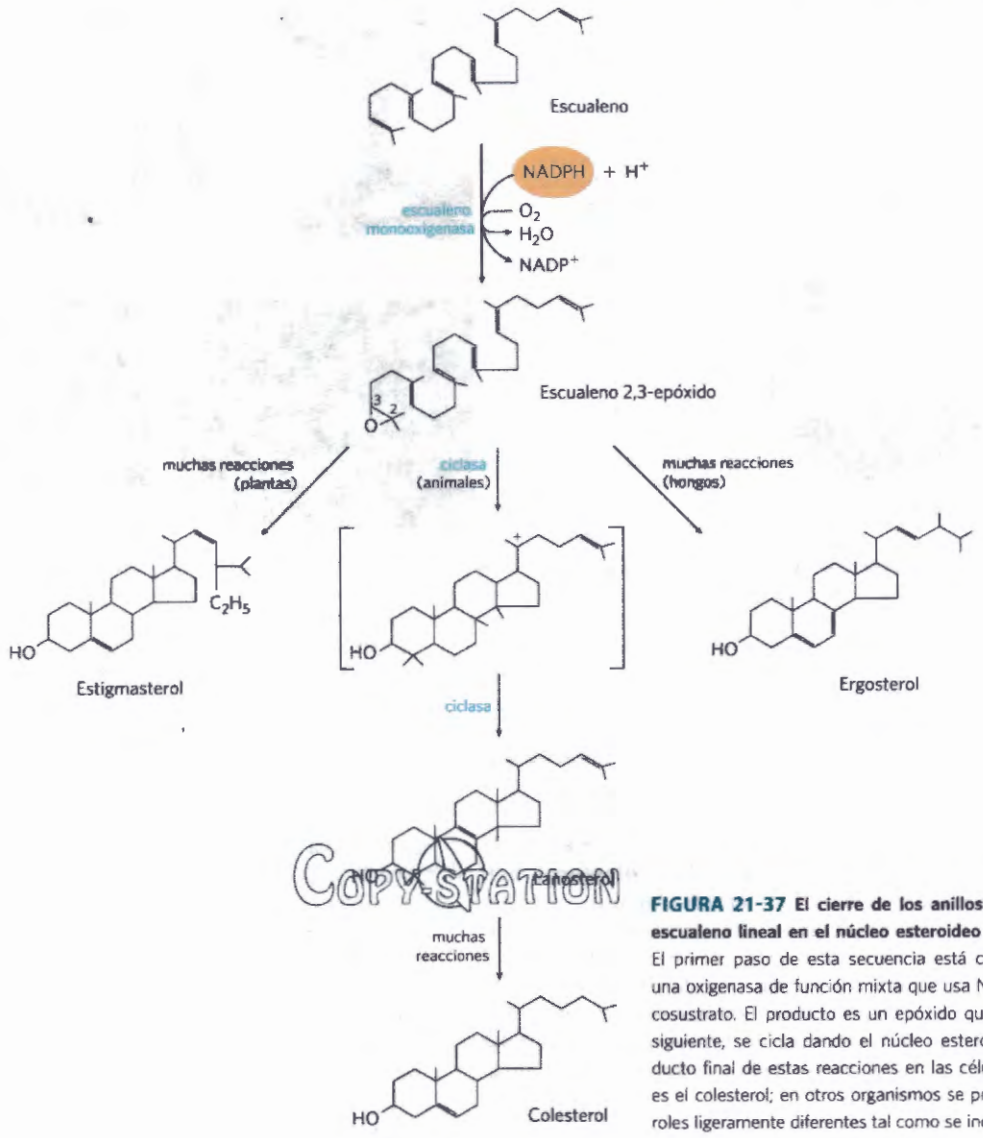
¿Cuál es el coste energético de la síntesis del escualeno a partir de acetil-CoA, en número de ATP por molécula sintetizada?

Solución: En la ruta del acetil-CoA al escualeno, sólo se consume ATP en los pasos que convierten el mevalonato en los precursores del escualeno, los isoprenos activados. Para la formación de cada uno de los seis isoprenos activados necesarios para sintetizar el escualeno se utilizan tres moléculas de ATP, es decir un coste total de 18 moléculas de ATP.

El colesterol tiene varios destinos

La mayor parte de la síntesis de colesterol en los vertebrados tiene lugar en el hígado. Una pequeña fracción del colesterol allí elaborado se incorpora a las membranas de los hepatocitos, pero la mayor parte se exporta en una de las tres formas siguientes: ácidos biliares colesterol biliar, o ésteres de colesterol **(Fig. 21-38)**. En el hígado se forman pequeñas cantidades de oxiesteroles, tales como el 25-hidroxicolesterol, que actúan como reguladores de la síntesis de colesterol (véase más adelante). En otros tejidos, el colesterol se convierte en hormonas esteroideas (en la corteza suprarrenal y en las gónadas, por ejemplo; véase la Fig. 10-18) o en hormona de la vitamina D (en el hígado y riñón; véase la Fig. 10-19). Estas hormonas son señales biológicas muy potentes que actúan a través de proteínas receptoras nucleares.

Los **ácidos biliares**, una de las tres formas de colesterol exportado desde el hígado son los componentes principales de la bilis, un fluido almacenado en la vesícula biliar que se excreta al intestino delgado para ayudar en la digestión de comidas que contienen grasas. Los ácidos biliares y sus sales son derivados del colesterol relativamente hidrofílicos sintetizados en el hígado y que actúan como emulgentes en el intestino delgado en donde convierten grandes partículas de grasa en pequeñas micelas con lo que se aumenta mucho la superficie sobre la que pueden actuar las lipasas digestivas (véase la Fig. 17-1). La bilis también contiene cantidades mucho menores de colesterol (colesterol biliar).



COPYSTATION

FIGURA 21-37 El cierre de los anillos convierte el escualeno lineal en el núcleo esteroideo condensado. El primer paso de esta secuencia está catalizado por una oxigenasa de función mixta que usa NADPH como cosustrato. El producto es un epóxido que, en el paso siguiente, se cicla dando el núcleo esteroideo. El producto final de estas reacciones en las células animales es el colesterol; en otros organismos se producen esteroles ligeramente diferentes tal como se indica.

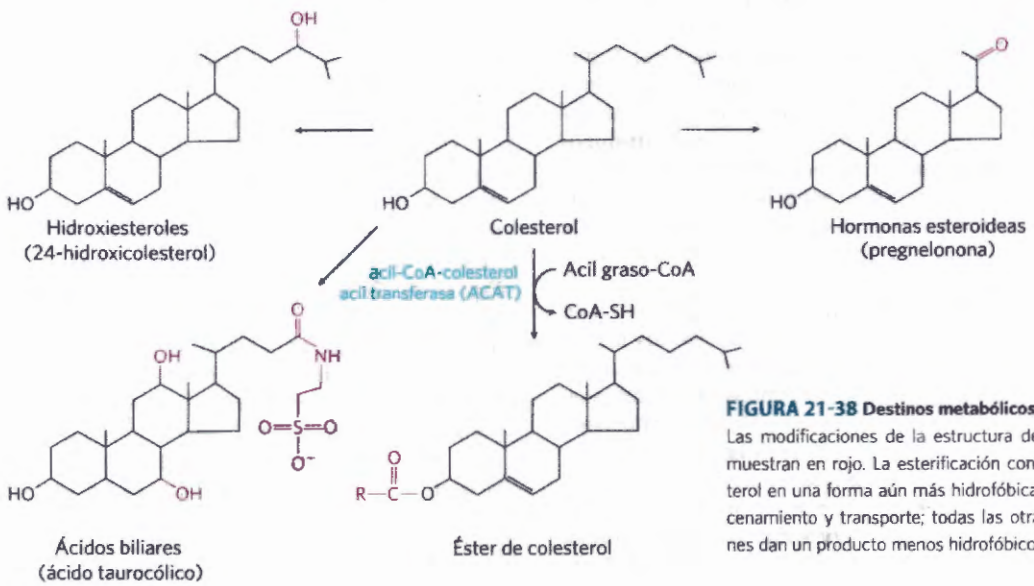


FIGURA 21-38 Destinos metabólicos del colesterol. Las modificaciones de la estructura del colesterol se muestran en rojo. La esterificación convierte el colesterol en una forma aún más hidrofóbica para su almacenamiento y transporte; todas las otras modificaciones dan un producto menos hidrofóbico.

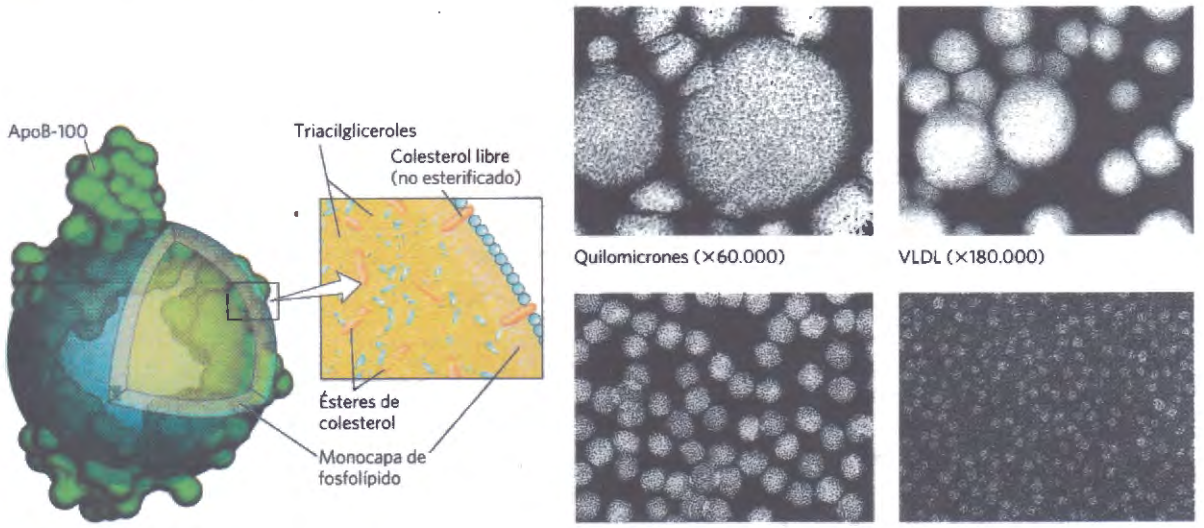


FIGURA 21-39 Lipoproteínas. (a) Estructura de una lipoproteína de densidad baja (LDL). La apolipoproteína B-100 (apoB-100) es una de las mayores cadenas polipeptídicas conocidas, con 4.636 residuos aminoácidos (M_r 512.000). Una partícula de LDL contiene un núcleo con unas 1.500 moléculas de ésteres de colesterol, rodeadas por una capa de unas 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípidos y una molécula de apoB-100. **(b)** Cuatro clases de lipoproteínas visualizadas al microscopio electrónico tras tinción negativa. Arriba a la izquierda, quilomicrones (50-200 nm de diámetro); arriba a la derecha, VLDL (28-70 nm); abajo a la izquierda, LDL (20-25 nm); abajo a la derecha, HDL (8-11 nm). Los tamaños de partícula mencionados son los medidos a partir de estas muestras; los tamaños de partícula varían considerablemente según las preparaciones. Para las propiedades de las lipoproteínas véase la Tabla 21-2. [Fuentes: (a) ApoB-100 modelada utilizando datos de A. Johs et al., *J. Biol. Chem.* 281:19, 732, 2006. (b) Robert Hamilton, Jr. PhD.]

Los **ésteres de colesterol** se forman en el hígado mediante la acción de la **acil-CoA-colesterol acil transferasa (ACAT).** Este enzima cataliza la transferencia de un ácido graso del coenzima A al grupo hidroxilo del colesterol (Fig. 21-38), convirtiendo el colesterol en una forma más hidrofóbica que no puede penetrar en las membranas. Los ésteres de colesterol se transportan en partículas de lipoproteínas secretadas hacia otros tejidos que utilizan colesterol o bien se almacenan en el hígado.

Las lipoproteínas plasmáticas transportan el colesterol y otros lípidos

El colesterol y sus ésteres, al igual que los triacilgliceroles y los fosfolípidos, son prácticamente insolubles en agua. No obstante, estos lípidos deben ser transportados desde el tejido de origen hasta los tejidos donde serán almacenados o consumidos. Son transportados en el plasma sanguíneo en forma de **lipoproteínas plasmáticas,** complejos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, denominadas **apolipoproteínas,** con diversas combinaciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles.

Las apolipoproteínas ("apo" designa la proteína en su forma libre de lípidos) se combinan con los lípidos para formar diversas clases de partículas lipoproteicas que son complejos esféricos con lípidos hidrofóbicos en el núcleo y cadenas laterales hidrofílicas de aminoácidos de la proteína en la superficie **(Fig. 21-39a)**. Diferentes combinaciones de lípidos y proteínas dan lugar a partículas de densidades diferentes, que van desde los quilomicrones hasta las lipoproteínas de alta densidad. Estas partículas se pueden separar por ultracentrifugación (Tabla 21-1) y visualizarse por microscopia electrónica (Fig. 21-39b).

Cada clase de lipoproteína tiene una función específica, determinada por su lugar de síntesis, composición lipídica y contenido en apolipoproteínas. En las lipoproteínas del plasma humano se encuentran al menos diez apolipoproteínas diferentes (Tabla 21-2). Las apolipoproteínas pueden diferenciarse por su tamaño, reacciones con anticuerpos específicos y distribución característica en las clases de lipoproteínas. Estos componentes proteicos actúan como señales que dirigen las lipoproteínas a tejidos específicos o como activadores de enzimas que actúan sobre las lipoproteínas. También se ha postulado su intervención en enfermedades; el Recuadro 21-2 describe una relación entre apoE y la enfermedad de Alzheimer. La **Figura 21-40** presenta una visión general de la formación y transporte de las lipoproteínas en mamíferos. Los pasos numerados en la discusión que sigue se refieren a esta figura.

Los **quilomicrones,** discutidos en el Capítulo 17 en conexión con el transporte de los triacilgliceroles de la dieta desde el intestino a otros tejidos, son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad y contienen una elevada proporción de triacilgliceroles (véase la Fig. 17-2). ❶ Los quilomicrones se sintetizan en el RE de los enterocitos, células epiteliales que recubren el intestino delgado, y a continuación se trasladan por el sistema linfático hasta entrar en el torrente circulatorio a través de la vena subclavia izquierda. Entre las apolipoproteínas de los quilomicrones se cuentan la apoB-48 (que sólo se encuentra en esta clase de lipoproteínas), la apoE y la apoC-II (Tabla 21-2). ❷ La apoC-II activa la lipoproteína lipasa en los capilares de los tejidos adiposo, cardíaco, muscular esquelético, y mamario en época de lactación, permitiendo la liberación de ácidos

TABLA 21-1 Clases principales de lipoproteínas plasmáticas humanas: algunas propiedades

		Composición (peso%)				
Lipoproteína	Densidad (g/mL)	Proteína	Fosfolípidos	Colesterol libre	Ésteres de colesterol	Triacilgliceroles
Quilomicrones	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95–1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006–1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063–1,210	55	24	2	15	4

Fuente: Datos de D. Kritchevsky, *Nutr. Int.* 2:290, 1986.

grasos a estos tejidos (FFA). De este modo los quilomicrones transportan los ácidos grasos de la dieta hasta los tejidos en donde serán almacenados o consumidos como combustible. ❸ Los quilomicrones residuales, desprovistos de la mayor parte de sus triacilgliceroles, pero que aún contienen colesterol, apoE y apoB-48, se desplazan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado. Receptores hepáticos se unen a la apoE de los quilomicrones residuales y facilitan la captación de estos residuos por endocitosis. ❹ En el hígado los quilomicrones residuales ceden su colesterol y se degradan en los lisosomas. Esta ruta del colesterol de la dieta hasta el hígado es la **ruta exógena** (flechas azules en la Fig. 21-40).

Cuando la dieta contiene más ácidos grasos y colesterol de los que son necesarios inmediatamente como combustible o como precursores de otras moléculas, se convierten ❺ en triacilgliceroles y ésteres del colesterol en el hígado y se empaquetan con apolipoproteínas específicas formando las **lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL, "very low-density lipoproteins").** El exceso de glúcidos en la dieta también se puede convertir en triacilgliceroles en el hígado exportándose en forma de VLDL. Además de los triacilgliceroles y ésteres del colesterol, las VLDL contienen apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III y apoE (Tabla 21-2). Las LDL se transportan en la sangre desde el hígado al músculo y al tejido adiposo. ❻ En los capilares de estos tejidos, la apoC-II activa la lipoproteína lipasa que cataliza la liberación de los ácidos grasos de los triacilgliceroles de las VLDL. Los adipocitos captan estos ácidos grasos, los reconvierten en triacilgliceroles y los almacenan en gotículas lipídicas intracelulares; los miocitos, por el contrario, oxidan mayoritariamente los ácidos grasos para obtener energía. Cuando el nivel de insulina es elevado (después de una comida), las VLDL sirven principalmente para transportar lípidos de la dieta al tejido adiposo para su almacenamiento. En el estado de ayuno entre comidas, los ácidos grasos utilizados para producir VLDL en el hígado proceden principalmente del tejido adiposo y la principal diana son los miocitos del corazón y del músculo esquelético.

La pérdida de triacilgliceroles convierte parte de las VLDL en VLDL residuales, también denominadas lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); la pérdida adicional de triacilgliceroles de las IDL (VLDL residuales) produce **lipoproteínas de densidad baja, (LDL,**

TABLA 21-2 Apolipoproteínas de las lipoproteínas del plasma humano

Apolipoproteína	Polipéptido masa molecular	Lipoproteína asociada	Función (si se conoce)
ApoA-I	28,100	HDL	Activa la LCAT; interacciona con el transportador ABC
ApoA-II	17,400	HDL	Inhibe la LCAT
ApoA-IV	44,500	Quilomicrones, HDL	Activa la LCAT; transporte/eliminación de colesterol
ApoB-48	242,000	Quilomicrones	Transporte/eliminación de colesterol
ApoB-100	512,000	VLDL, LDL	Se une al receptor de LDL
ApoC-I	7,000	VLDL, HDL	
ApoC-II	9,000	Quilomicrones, VLDL, HDL	Activa la lipoproteína lipasa
ApoC-III	9,000	Quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibe la lipoproteína lipasa
ApoD	32,500	HDL	
ApoE	34,200	Quilomicrones, VLDL, HDL	Promueve la eliminación de VLDL y los quilomicrones residuales
ApoH	50,000	Posiblemente VLDL, une fosfolípidos tales como la cardiolipina	Papel en la coagulación, metabolismo lipídico, apoptosis, inflamación

Fuente: Datos de D. Kritchevsky, *Nutr. Int.* 2:290, 1986.

RECUADRO 21-2 MEDICINA Los alelos de la Apo E predicen la incidencia de la enfermedad de Alzheimer

En la población humana existen tres variantes comunes, o alelos, del gen que codifica la apolipoproteína E. El más común, que representa aproximadamente el 78% de los alelos humanos de apoE, es el *APOE3*; los alelos *APOE4* y *APOE2* representan el 15% y 7%, respectivamente. El alelo *APOE4* es especialmente común en humanos que presentan la enfermedad de Alzheimer, siendo la relación altamente predictiva. Los individuos que han heredado el alelo *APOE4* tienen un riesgo superior de padecer la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. Los que son homocigotos para el alelo *APOE4* tienen un riesgo 16 veces superior de desarrollar la enfermedad; para los que la desarrollan la edad media de aparición está justo por debajo de los 70 años. Los individuos que han heredado dos copias del alelo *APOE3*, en cambio, tienen una edad media de inicio de la enfermedad de Alzheimer superior a los 90 años.

Las bases moleculares de la asociación entre la apoE-4 y la enfermedad de Alzheimer todavía no son conocidas. Tampoco se sabe con certeza de qué modo apoE-4 podría afectar el crecimiento de las fibras de amiloide que parecen ser los agentes causales primarios de la enfermedad (véase la Fig. 4-32). Se ha especulado sobre un posible papel de la apoE en la estabilización de la estructura del citoesqueleto de las neuronas. Las proteínas apoE-2 y apoE-3 se unen a ciertas proteínas asociadas a los microtúbulos neuronales, pero no así la apoE-4. Esto podría acelerar la muerte de las neuronas. Cualquiera que sea el mecanismo, estas observaciones prometen ampliar nuestro conocimiento de las funciones biológicas de las apolipoproteínas.

"low-density lipoproteins"). Muy ricas en colesterol y ésteres de colesterol, y con apoB-100 como principal apolipoproteína, ❼ las LDL transportan el colesterol hasta los tejidos extrahepáticos tales como el músculo, glándulas suprarrenales y tejido adiposo. Estos tejidos tienen receptores de LDL en la membrana plasmática que reconocen la apoB-100 y facilitan la captación del colesterol y los ésteres de colesterol. ❽ Las LDL también suministran colesterol a los macrófagos, convirtiéndolos, a veces, en células espumosas (véase la Fig. 21-46). ❾ Las LDL que no han sido captadas en los tejidos y células periféricos retornan al hígado y son captadas por **receptores de LDL** de la membrana plasmática de los hepatocitos. El colesterol que entra en los hepatocitos por esta vía puede incorporarse a las membranas, convertirse en ácidos biliares o ser reesterificado por la ACAT (Fig. 21-38) para su almacenamiento en gotículas de lípido citosólicas. Esta ruta, desde la formación de VLDL en el hígado y el retorno deLDL al hígado, es la **ruta endógena** del metabolismo y transporte del colesterol (flechas rojas en la Fig. 21-40). Se impide la acumulación de exceso de colesterol intracelular por reducción de la velocidad de síntesis de colesterol cuando hay suficiente colesterol disponible en forma de LDL en la sangre. Más adelante se describen mecanismos reguladores que permiten conseguir este objetivo. Volveremos a la Fig. 21-40 y otras rutas del transporte de lipoproteínas después de discutir la captación de LDL por las células.

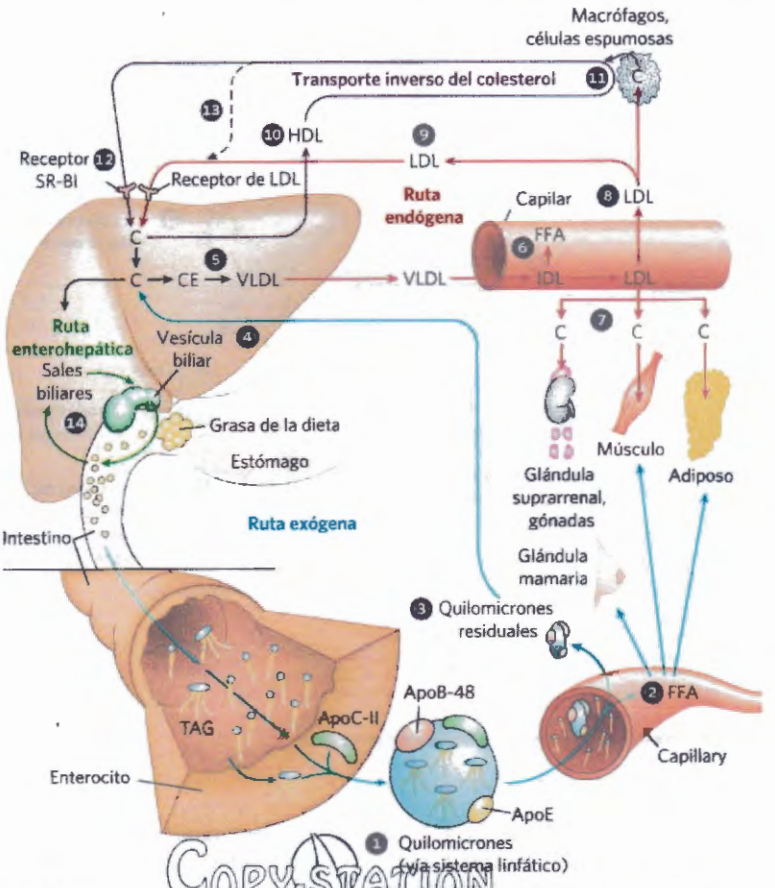
Los ésteres de colesterol entran en las células por endocitosis facilitada por receptor

Cada partícula de LDL en el torrente sanguíneo contiene apoB-100, que es reconocida por receptores de LDL presentes en las membranas plasmáticas de las células que necesitan captar colesterol. La **Figura 21-41** muestra una célula de este tipo, en la que ❶ los receptores de LDL se sintetizan en el retículo endoplasmático y se transportan a la membrana plasmática, después de ser modificados en el complejo de Golgi en donde están listos para unir apoB-100. ❷ La unión de la LDL a su receptor inicia la endocitosis, que ❸ lleva la LDL y su receptor al interior de la célula dentro de un endosoma. ❹ Porciones de la membrana del endosoma que contienen receptores se segregan en vesículas y vuelven a la superficie celular para actuar de nuevo en la captación de LDL. ❺ El endosoma se fusiona con un lisosoma que ❻ contiene enzimas que hidrolizan los ésteres de colesterol, liberando colesterol y ácidos grasos al citosol. La proteína apoB-100 se degrada también dando aminoáci-

COPY-STATION



Michael Brown and Joseph Goldstein [Fuente: Mei-Chun Jau. Cortesía de Michael Brown and Joseph Goldstein, University of Texas Southwestern Medical Center.]



COPY-STATION

FIGURA 21-40 Lipoproteínas y transporte de lípidos. (a) Los lípidos son transportados en el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas, de las que hay varios tipos con diferentes funciones, diferentes composiciones en lípidos y proteínas (véanse las Tablas 21-1 y 21-2) y, por tanto, diferentes densidades. Los pasos numerados se describen en el texto. En la ruta exógena (flechas azules) los lípidos de la dieta se empaquetan en los quilomicrones; se liberan ácidos grasos de triacilgliceroles (TAG) por la lipoproteína lipasa en los tejidos adiposo y muscular durante el transporte a través de los capilares. Los quilomicrones residuales (que contienen principalmente proteína y colesterol) son captados por el hígado. Las sales biliares producidas en el hígado ayudan a dispersar las grasas de la dieta y se vuelven a reabsorber en la ruta enterohepática (flechas verdes). En la ruta endógena (flechas rojas) los lípidos sintetizados o empaquetados en el hígado se envían a los tejidos periféricos con la VLDL. La extracción de lípidos de la VLDL (junto con la pérdida de algunas apolipoproteínas) la convierten gradualmente en LDL, que transfiere el colesterol a los tejidos extrahepáticos o vuelve al hígado. El exceso de colesterol en los tejidos extrahepáticos se transporta de nuevo al hígado en forma de HDL en el transporte inverso del colesterol (flechas púrpura). C representa el colesterol; CE representa éster de colesterol.

dos que se liberan al citosol. La apoB-100 está también presente en la VLDL, pero su dominio de unión al receptor no es accesible para unirse al receptor de LDL; la conversión de la VLDL en LDL expone el dominio de unión al receptor de la apoB-100.

Esta ruta de transporte de colesterol en la sangre y su **endocitosis facilitada por receptor** en los tejidos diana fue dilucidada por Michael Brown y Joseph Goldstein. Descubrieron que individuos con la enfermedad genética **hipercolesterolemia familiar (FH)** presentan mutaciones en el receptor de LDL que impiden la captación normal de LDL por el hígado y tejidos periféricos. El resultado de la captación defectuosa de LDL es la presencia de niveles elevados de LDL (y del colesterol que transporta) en sangre. Los individuos con FH tienen una probabilidad mucho mayor de desarrollar ateroesclerosis, una enfermedad del sistema cardiovascular en la que los vasos sanguíneos están bloqueados por placas ricas en colesterol (véase la Fig. 21-46).

La enfermedad de **Niemann-Pick tipo C (NPC)** es una patología heredada del almacenamiento de lípidos en la que no se transporta el colesterol fuera de los lisosomas sino que se acumula en los lisosomas del hígado, cerebro y pulmones provocando una muerte temprana. NPC es el resultado de una mutación en cualquiera de dos genes (*NPC1, NPC2*) esenciales para transportar el colesterol desde el lisosoma al citosol donde puede continuar su metabolismo. *NPC1* codifica una proteína lisosómica transmembrana mientras que *NPC2* codifica una proteína soluble. Estas proteínas actúan en tándem para transferir el colesterol fuera del lisosoma al citosol para su posterior modificación o metabolismo. ■

La HDL lleva a cabo el transporte de colesterol inverso

Una cuarta lipoproteína importante en los mamíferos, la **lipoproteína de densidad alta, (HDL, "high-density lipoprotein),** ❶ se sintetiza en el hígado y en el intestino delgado en forma de partículas pequeñas, ricas en proteína, que contienen relativamente poco colesterol y nada de sus ésteres (todos los números de

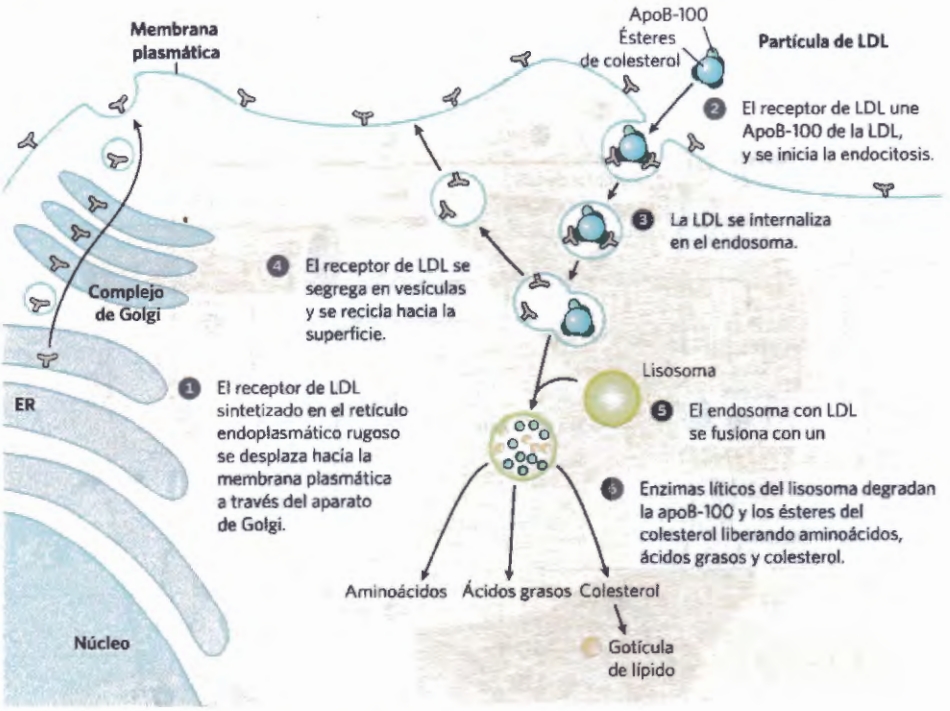


FIGURA 21-41 Captación del colesterol por endocitosis facilitada por receptor.

etapa aquí mostrados se refieren a la Fig. 21-40). Las HDL contienen principalmente apoA-I y otras apolipoproteínas (Tabla 21-2), además del enzima **lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT),** que cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de la lecitina (fosfatidilcolina) y colesterol **(Fig. 21-42)**. La LCAT en la superficie de las partículas de HDL nacientes (que se están formando) convierte el colesterol y la fosfatidilcolina de los quilomicrones y de las VLDL residuales del torrente circulatorio en ésteres de colesterol, los cuales empiezan a formar un núcleo, transformando la HDL naciente, que tiene forma discoidal, en una partícula esférica de HDL madura. ⓫ La HDL naciente también puede captar colesterol de las células extrahepáticas ricas en colesterol (entre ellas macrófagos y células espumosas formadas a partir de los mismos; véase más adelante). ⓬ La HDL madura, rica en colesterol, retorna ahora al hígado donde descarga el colesterol a través del receptor limpiador SR-BI. ⓭ Parte de los ésteres del colesterol en las HDL también se puede transferir a las LDL mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol; el circuito de las HDL constituye el **transporte inverso de colesterol** (flechas púrpura en la Fig. 21-40). Gran parte de este colesterol se convierte en sales biliares por enzimas secuestrados en peroxisomas hepáticos; las sales biliares se almacenan en la vesícula biliar y se excretan al intestino después de una comida. Las sales biliares son reabsorbidas por el hígado ⓮ y recirculan a través de la vesícula biliar en esta **circulación enterohepática** (flechas verdes en la Fig. 21-40).

La descarga de esteroles vía receptor SR-BI en el hígado y otros tejidos no interviene la endocitosis, mecanismo utilizado para la captación de LDL. En su lugar, cuando la HDL se une a los receptores SR-BI de la membrana plasmática de los hepatocitos o tejidos esteroidogénicos tales como la grándula suprarrenal, estos receptores facilitan la transferencia parcial y selectiva del colesterol y otros lípidos presentes en la HDL al interior de la célula. La HDL descargada se disocia entonces para recircular en el torrente circulatorio y extrae más lípidos de los quilomicrones residuales y de las LDL así como de las células sobrecargadas con colesterol tal como se describe más adelante.

La síntesis y transporte del colesterol están regulados a diversos niveles

La síntesis de colesterol es un proceso complejo y energéticamente caro. El exceso de colesterol no puede ser catabolizado para su utilización como combustible por lo que ha de ser excretado. Por tanto es claramente ventajoso para un organismo poder regular la biosíntesis del colesterol de modo que complemente la ingestión del mismo en la dieta. En los mamíferos, la producción de colesterol está regulada por su concentración intracelular, por el suministro de ATP y por las hormonas glucagón e insulina. El paso que compromete a la ruta hacia el colesterol (y que es un sitio principal de regulación) es la conversión del HMG-CoA en mevalonato (Fig. 21-34), reacción catalizada por el enzima HMG-CoA reductasa.

La regulación a corto plazo de la *actividad* de la HMG-CoA reductasa existente se consigue mediante alteración covalente reversible: fosforilación por la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK), que detecta una concentración de AMP elevada (lo que indica baja concentración de ATP). Así, cuando disminuye la concentración de ATP, disminuye la síntesis de colesterol mientras que se estimulan las rutas catabólicas de

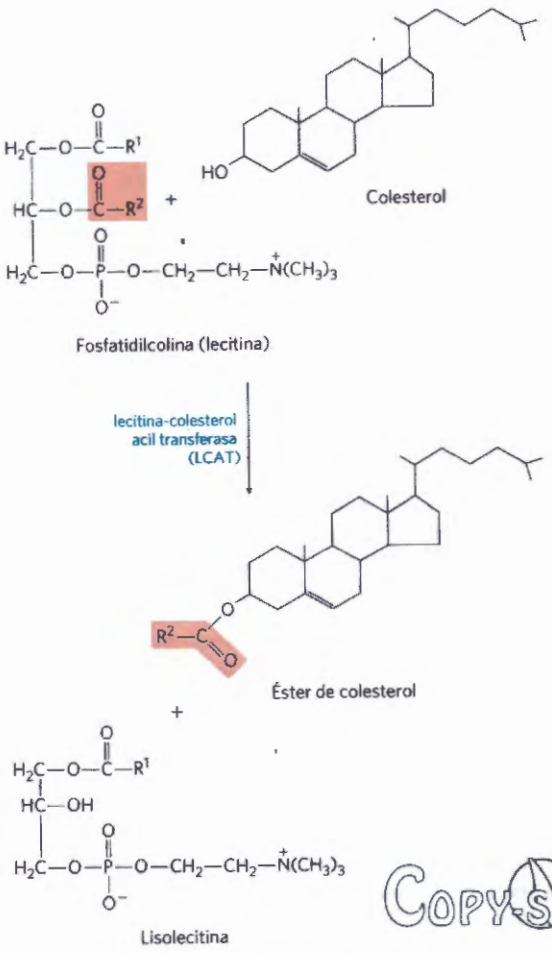


FIGURA 21-42 Reacción catalizada por la lecitina-colesterol acilo transferasa (LCAT). Este enzima está presente en la superficie de las HDL y es estimulado por apoA-I, un componente de la HDL. Los ésteres de colesterol se acumulan en las HDL nacientes convirtiéndolas en HDL maduras.

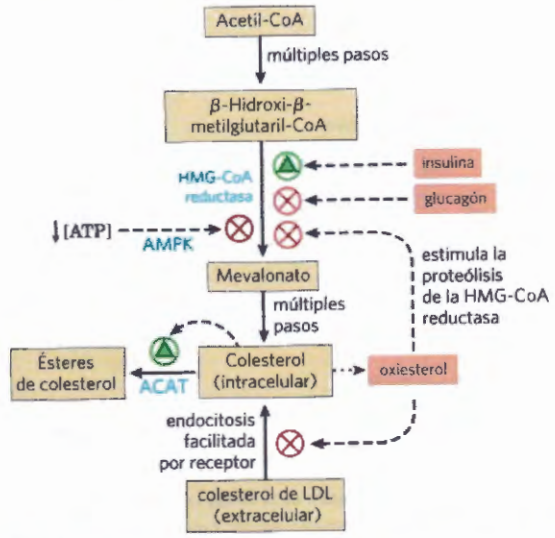


FIGURA 21-43 La regulación de la formación de colesterol equilibra nla síntesis con la captación de la dieta y el estado energético. La insulina promueve la desfosforilación (activaciónm) de la HMG-CoA reductasa; el glucagón promueve su fosforilación (inactivación) y la proteína quinasa dependiente de AMP, la AMPK, cuando está activada por una baja [ATP] en relación a [AMP], fosforila e inactiva la HMG-CoA reductasa. Oxiesteroles metabolitos del colesterol (pro ej. 24(*S*)-hidroxicolesterol) estimula la proteólisis de la HMG.CoA reductasa.

generación de ATP **(Fig. 21-43)**. Las hormonas que intervienen en la regulación global del metabolismo de lípidos y glúcidos también actúan sobre la HMG-Co reductasa; el glucagón estimula la fosforilación (inactivación), mientras que la insulina promueve la desfosforilación que activa el enzima y favorece la síntesis de colesterol. Estos mecanismos reguladores covalentes probablemente no son tan importantes, cuantitativamente, como los mecanismos que afectan la síntesis y degradación del enzima.

A largo plazo, el *número de moléculas* de HMG-CoA reductasa aumenta o disminuye en respuesta a la concentración celular de colesterol. La regulación de la síntesis de HMG-CoA reductasa por la concentración de colesterol tiene lugar mediante un elegante sistema de regulación de la transcripción del gen que codifica la HMG-CoA reductasa **(Fig. 21-44)**. Este gen, junto con más de otros 20 genes codificadores de enzimas que intervienen en la captación y síntesis del colesterol y de ácidos grasos insaturados, está controlado por una pequeña familia de proteínas denominadas **proteínas de unión del elemento regulador de esteroles (SREBP)**. Inmediatamente después de su síntesis estas proteínas están incrustadas en el RE. Sólo el fragmento del dominio regulador soluble de una SREBP funciona como activador de la transcripción mediante mecanismos que se discuten en el Capítulo 28. Cuando los niveles de colesterol y oxiesterol son elevados, las SREBP son inactivas, y están retenidas en el RE formando complejo con otra proteína denominada **proteína activadora del corte de la SREBP (SCAP)** que, a su vez, está anclada en la membrana del RE por interacción con una tercera proteína de membrana, **Insig (*ins*ulin-*i*nduced *g*ene protein: proteína génica inducida por la insulina)** (Fig. 21-44a). Cuando los niveles de esteroles son elevados, el complejo Insig-SCAP-SREBP es retenido en el RE. Cuando disminuye el nivel de esteroles en la célula (Fig. 21-44b), el complejo SCAP-SREBP es escoltado por proteínas secretoras hasta el complejo de Golgi. Allí la SREBP es cortada proteolíticamente y se libera un fragmento regulador que se desplaza hasta el núcleo y activa la transcripción de sus genes diana, incluidas la HMG-CoA reductasa, la proteína receptora de la LDL y otras proteínas necesarias para la síntesis de lípidos. Cuando los niveles de esteroles aumentan suficientemente, vuelve a bloquearse la liberación proteolítica de los dominios amino-terminales de las SREBP con lo que la rápida degradación por el proteasoma de los dominios activos existentes dan lugar a una desconexión rápida de los genes diana.

A largo plazo, el nivel de HMG-CoA reductasa también está regulado por degradación proteolítica del propio enzima. Insig detecta niveles elevados de colesterol celular lo que provoca la unión de moléculas de ubiquitina a la HMG-CoA reductasa lo que comporta su degradación por los proteasomas (Fig. 27-50).

El **receptor X hepático (LXR)** es un factor de transcripción nuclear activado por ligandos oxiesteroles

COPY-STATION

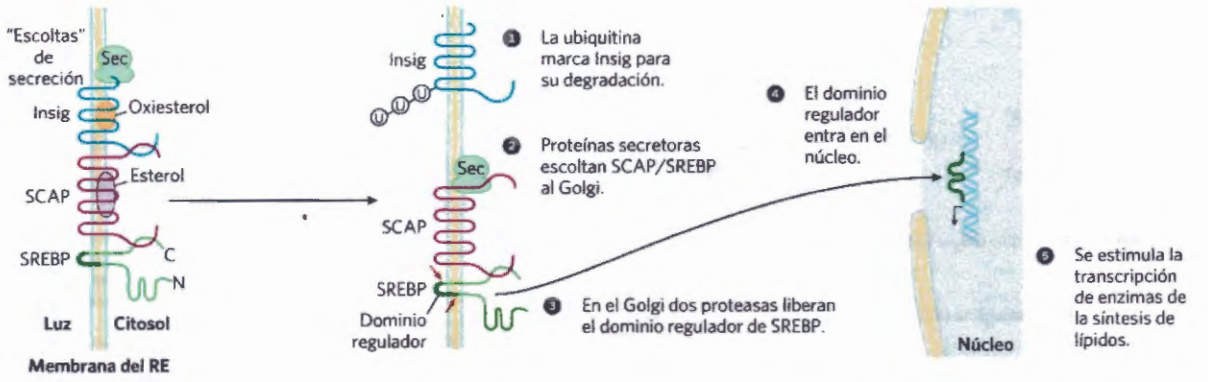


FIGURA 21-44 Regulación de la síntesis de colesterol por SREBP. Las proteínas de unión al elemento regulador por esteroles (SREBP, en verde) se incrustan en el RE cuando son sintetizadas formando un complejo con la proteína activadora del corte de las SREBP (SCAP, rojo), que a su vez, se une a Insig. (N y C representan los extremos amino- y carboxilo-terminales de las proteínas). **(a)** Las SREBP son inactivas cuando se encuentran unidas a SCAP e Insig. **(b)** Cuando desciende la concentración de esteroles, los sitios de unión de esteroles en Insig y SCAP no están ocupados, el complejo migra hacia el complejo de Golgi y las SREBP son cortadas (flechas rojas) para producir un fragmento que es un dominio regulador. **(c)** Este dominio actúa en el núcleo e incrementa la transcripción de genes regulados por esteroles. La unión de varias moléculas de ubiquitina marca la Insig para su degradación. [Fuente: Información de R. Raghow et al., *Trends Endocrinol. Metab.* 19:65, 2008, Fig. 2.]

(reflejo de elevados niveles de colesterol), que integra el metabolismo de ácidos grasos, esteroles y glucosa. LXRα se expresa principalmente en el hígado, tejido adiposo y macrófagos; LXRβ está presente en todos los tejidos. Cuando están unidos a un ligando oxiesterol, los LXR forman heterodímeros con un segundo tipo de receptor nuclear, los **receptores X retinoides (RXR)**, y el dímero LXR-RXR activa la transcripción de un conjunto de genes **(Fig. 21-45)** entre los que se incluyen los de la acetil-CoA carboxilasa, primer enzima de la síntesis de ácidos grasos; la ácido graso sintasa; CYP7A1, un enzima citocromo P450, requerido para la conversión de esterol en ácido biliar; apoproteínas que participan en el transporte de colesterol (apoC-I. apoC-II, apoD y apoE); los transportadores cassette de unión de ATP (ABC) ABCA1 y ABCG1 necesarios en el transporte inverso del colesterol (véase más adelante); GLUT4, el transportador de glucosa estimulado por insulina de los tejidos muscular y adiposo y una SREBP denominada SREBP1C. Los reguladores de la transcripción LXR y SREBP actúan, por tanto, de manera conjunta para conseguir y mantener la homeostasis del colesterol; las SREBP se activan por niveles celulares bajos de colesterol y los LXR son activados por niveles elevados de colesterol.

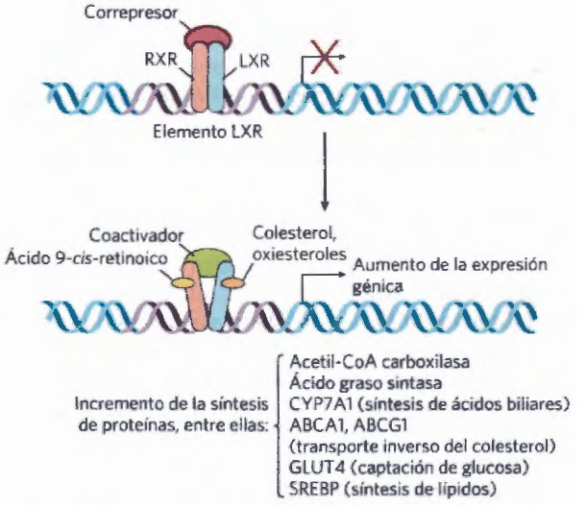


FIGURA 21-45 Acción del dímero RXR-LXR sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos y glucosa. En ausencia de sus ligandos, RXR y LXR se asocian con una proteína correpresora e impiden la transcripción de los genes asociados con el elemento LXR (LXRE). Cuando sus respectivos ligandos están presentes (ácido 9-*cis*-retinoico para RXR, colesterol o esteroles para LXR), el dímero se disocia del correpresor asociándose a continuación con una proteína coactivadora. Este complejo se une al elemento LXR y activa la expresión de los genes asociados. La regulación de la expresión génica es un tema discutido con mayor detalle en el Capítulo 28. [Fuente: Información de A. C. Calkin and P. Tontonoz, *Mol. Cell Biol.* 13:213, 2012, Fig. 1.]

La regulación por los LXR está complementada por la actividad del receptor X del farnesol (FXR), que también forma un heterodímero con RXR, con un efecto que, a menudo, es recíproco del de LXR-RXR. Aunque el farnesol es un ligando de este receptor, FXR responde principalmente a los ácidos biliares. Concentraciones elevadas de ácidos biliares pueden ser tóxicas. FXR, expresado principalmente en el intestino, hígado, riñón y glándulas adrenales, proporciona un control esencial sobre los niveles de ácidos biliares al aumentar o disminuir la expresión de genes múltiples. Por ejemplo, LXR activa la transcripción del enzima del citocromo P-450 CYP7A1, que promueve la formación de ácidos biliares a partir de esteroles. FXR reprime la transcripción de CYP7A1 cuando los niveles de ácidos biliares son elevados.

Finalmente, hay otros dos mecanismos reguladores que influyen en el nivel de colesterol celular: (1) concentraciones intracelulares elevadas de colesterol activan la ACAT, que aumenta la esterificación de colesterol para su almacenamiento y (2) un nivel de colesterol

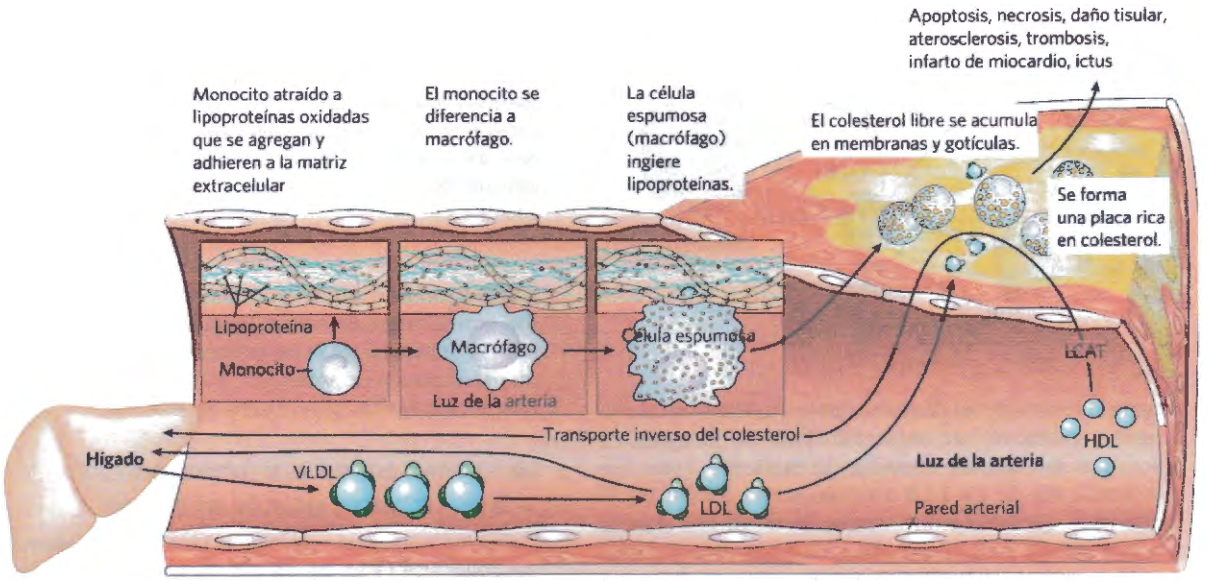


FIGURA 21-46 Formación de placas ateroescleróticas. El exceso de lípido proveniente de la dieta se deposita en las paredes arteriales, proceso facilitado por la conversión de monocitos en células espumosas e incorporación de estas a las placas en crecimiento. Parte de este depósito está contrarrestado por la HDL y el transporte inverso del colesterol. La reacción de la LCAT se muestra en la Figura 21-42.

celular elevado disminuye la transcripción (vía SREBP) del gen que codifica el receptor de la LDL, reduciendo la producción de receptores y, por tanto, la captación de colesterol desde la sangre.

COPY-STATION

El metabolismo desregulado del colesterol puede ser causa de enfermedad cardiovascular

Tal como se apuntó anteriormente, el colesterol no puede ser catabolizado por las células animales. El exceso de colesterol sólo puede eliminarse por excreción o por conversión en ácidos biliares.

Cuando la suma del colesterol sintetizado y el obtenido de la dieta supera la cantidad requerida para la síntesis de membranas, sales biliares y esteroides, se pueden desarrollar acumulaciones patológicas de colesterol en los vasos sanguíneos (placas) con el resultado de la obstrucción de estos vasos, una situación denominada **aterosclerosis.** Los fallos cardíacos debidos a la oclusión de las arterias coronarias son una causa principal de muerte en las sociedades industrializadas. La aterosclerosis está ligada a los niveles elevados de colesterol en sangre, y especialmente con los niveles elevados de colesterol asociado a la LDL ("colesterol malo"); existe una correlación *negativa* entre los niveles de HDL ("colesterol buen o") y la enfermedad arterial. La formación de placas en los vasos sanguíneos se inicia cuando la LDL que contiene grupos acilo graso parcialmente oxidados se adhiere y acumula en la matriz extracelular de las células epiteliales que cubren las arterias **(Fig. 21-46)**. Las células inmunitarias (monocitos) que se diferencian a macrófagos que captan LDL oxidada así como el colesterol que contienen son atraídas a regiones con tales acumulaciones de LDL. Los macrófagos no pueden limitar la captación de esteroles y con la acumulación creciente de ésteres de colesterol y colesterol libre los macrófagos se transforman en **células espumosas** (tiene apariencia espumosa en el microscopio). A medida que el exceso de colesterol libre se acumula en las células espumosas y sus membranas, experimentan apoptosis. Durante largos períodos de tiempo las arterias están cada vez más ocluidas a medida que las placas, formadas por material de la matriz extracelular, tejido de cicatrices formado a partir de tejido muscular liso y células espumosas residuales se hacen gradualmente más grandes. De vez en cuando una placa se rompe y queda suelta del sitio de su formación y se transporta a través de la sangre hasta una región más estrecha de una arteria del cerebro o del corazón lo que da lugar a un ictus o a un ataque de corazón.

En la hipercolesterolemia familiar, los niveles de colesterol en la sangre son extremadamente elevados, y los individuos afectados desarrollan aterosclerosis severa desde la niñez. El receptor de LDL es defectuoso en estos individuos con lo que no se produce la captación facilitada por receptor del colesterol transportado por la LDL. En consecuencia, el colesterol no es eliminado de la circulación; se acumula en células espumosas y contribuye a la formación de placas ateroscleróticas. La síntesis endógena de colesterol continúa a pesar del exceso de colesterol en la sangre, debido a que el colesterol extracelular no puede entrar en la célula para regular la síntesis intracelular (Fig. 21-44). Una clase de medicinas denominadas **estatinas**, algunas aisladas de fuentes naturales y otras sintetizadas por la industria, se utilizan en el tratamiento de pacientes con elevado colesterol producido por hipercolesterolemia familiar y otras enfermedades en las que la concentración de colesterol en el suero es elevada. Las estatinas se parecen al mevalonato (Recuadro 21-3) y son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa.

Una aproximación alternativa para controlar los niveles de colesterol sérico es activar los LXR, lo que

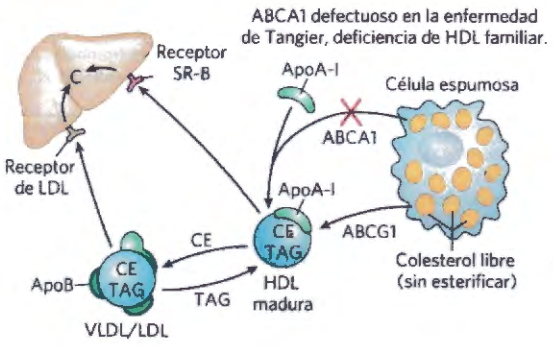


FIGURA 21-47 Transporte inverso del colesterol. ApoA-I y las HDL captan el exceso de colesterol (C) de las células periféricas, con participación de los transportadores ABCA1 ABCG1, y lo devuelven al hígado. En individuos con un ABCA1 genéticamente defectuoso, la falta de transporte inverso del colesterol lleva a enfermedades cardiovasculares graves de aparición temprana: la enfermedad de Tangier y la enfermedad de la deficiencia de HDL familiar. CE, ésteres de colesterol; TAG, triacilgliceroles. [Fuente: Información de A. R. Tall et al., *Cell Metab.* 7:365, 2008, Fig. 1.]

tiene el efecto global de disminuir la absorción de colesterol y promover su excreción. Éste es el modo de acción de un fármaco denominado exetimibe. Dado que la activación de los LXR también activa SREBP1C, lo que hace que el hígado incremente su producción de ácidos grasos y triacilgliceroles, se están desarrollando nuevos tipos de fármacos cuya diana sea únicamente los LXR intestinales. ■

El transporte inverso del colesterol por la HDL se opone a la formación de placas y a la ateroesclerosis

La HDL tiene un papel crítico en la ruta del transporte inverso del colesterol **(Fig. 21-47)** que reduce el daño potencial debido a la acumulación de células espumosas. La HDL descargada, baja en colesterol, capta el colesterol almacenado en tejidos extrahepáticos, entre ellos las células espumosas y las placas naciendes, transportándolo al hígado.

La salida del colesterol fuera de las células requiere transportadores. El genoma humano codifica 48 transportadores de la clase cassette de fijación de ATP (ABC), y de ellos, alrededor de la mitad, promueven el transporte de lípidos. Dos de ellos transportan colesterol al exterior de las células. En este proceso, la ApoA-I interacciona con un transportador ABC (ABCA1) en una célula rica en colesterol. ABCA1 transporta una gran cantidad de colesterol desde el interior de la célula a la superficie externa de la membrana plasmática, en donde es captado por ApoA-I sin lípido o con poco lípido que lo transporta al hígado. Otro transportador ABC, ABCG1, interacciona con HDL madura y facilita el desplazamiento del colesterol hacia el exterior de la célula y al interior de la HDL. Este proceso de salida es especialmente importante cuando afecta al transporte inverso del colesterol desde las células espumosas en los sitios de las placas que se forman en los vasos sanguíneos en individuos con patología cardiovascular.

Los niveles de HDL son muy bajos en la **deficiencia familiar de HDL**, y prácticamente indetectables en la **enfermedad de Tangier** (Fig. 21-47). Estas dos enfermedades genéticas son el resultado de mutaciones en la proteína ABC1. La ApoA-I desprovista de colesterol no puede captar el colesterol de las células que carecen de la proteína ABCA1, por lo que la ApoA-I y la HDL pobre en colesterol son eliminadas rápidamente de la sangre y destruidas. Tanto la deficiencia familiar de HDL como la enfermedad de Tangier son muy raras (se conocen menos de 100 familias con la enfermedad de Tangier en todo el mundo), pero la existencia de estas enfermedades ha establecido un papel para la proteína ABCA1 y ABCG1 en la regulación de los niveles plasmáticos de HDL. ■

Las hormonas esteroideas se forman por rotura de la cadena lateral y oxidación del colesterol

Todas las hormonas esteroideas humanas son derivados del colesterol **(Fig. 21-48)**. En la corteza de la glándula suprarrenal se sintetizan dos clases de hormonas esteroideas: los **mineralocorticoides**, que controlan la reabsorción de los iones inorgánicos (Na^+, Cl^- y HCO_3^-) por el riñón; y los **glucocorticoides**, que ayudan a regular la gluconeogénesis y reducen la respuesta inflamatoria. Las hormonas sexuales se sintetizan en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Incluyen la **progesterona**, que regula el ciclo reproductor femenino, y los **andrógenos** (p.ej., la testosterona) y los **estrógenos** (p.ej., el estradiol) que influyen en el desarrollo de las características sexuales secundarias en varones y hembras, respectivamente. Las hormonas esteroideas son efectivas a concentraciones muy bajas

Copy-Station

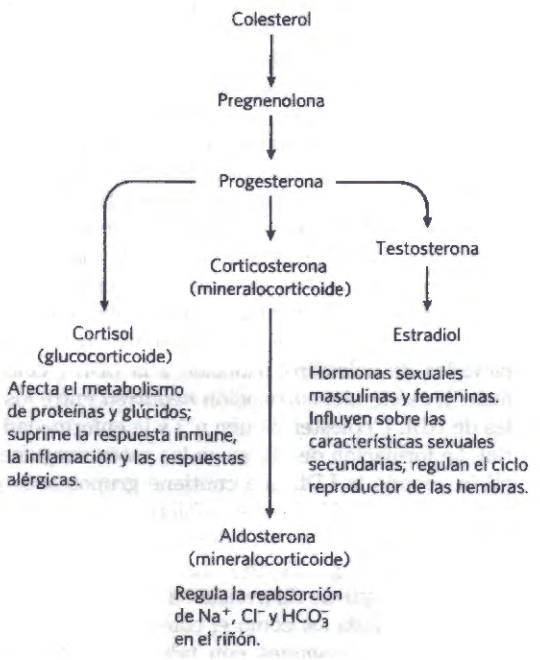
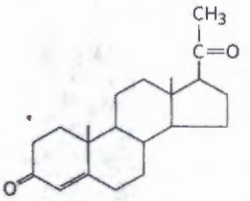


FIGURA 21-48 Algunas hormonas esteroideas derivadas del colesterol. Las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en la Figura 10-18.

y, por tanto, se sintetizan en cantidades relativamente pequeñas. En comparación con las sales biliares, su producción consume relativamente poco colesterol.



Progesterona

La síntesis de las hormonas esteroideas requiere la eliminación de alguno o todos los carbonos de la "cadena lateral" en C-17 del anillo D del colesterol. La eliminación de la cadena lateral tiene lugar en las mitocondrias de los tejidos que producen esteroides. La eliminación implica la hidroxilación de dos carbonos adyacentes de la cadena lateral (C-20 y C-22), seguida de la rotura del enlace entre ellos **(Fig. 21-49)**. En la formación de las diferentes hormonas también se necesita la introducción de átomos de oxígeno. Todas las reacciones de hidroxilación y oxigenación de la biosíntesis de esteroides están catalizadas por oxidasas de función mixta (Recuadro 21-1) que utilizan NADPH, O_2 y el citocromo mitocondrial P-450.

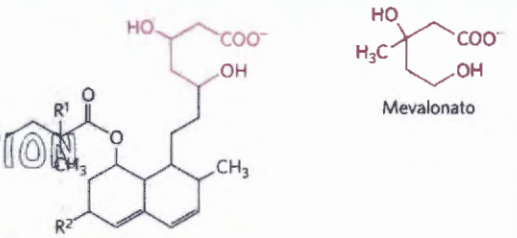
Los intermediarios de la síntesis del colesterol tienen muchos destinos alternativos

Además de su papel como intermediario en la biosíntesis del colesterol, el isopentenil pirofosfato es el precursor activado de un conjunto muy grande de biomoléculas con diversas funciones biológicas **(Fig. 21-50)**. Entre ellas se cuentan las vitaminas A, E y K; pigmentos vegetales tales como los carotenos y la cadena de fitol de la clorofila; el caucho natural; muchos aceites esenciales (tales como las esencias del aceite de limón, eucalipto y almizcle); la hormona juvenil de los insectos que controla la metamorfosis; los dolicoles que actúan como transportadores liposolubles en la síntesis de poli-

RECUADRO 21-3 MEDICINA La hipótesis lipídica y el desarrollo de las estatinas

La enfermedad de las arterias coronarias del corazón es la causa principal de muerte en los países desarrollados. Las arterias coronarias que llevan sangre al corazón se estrechan debido a la formación de depósitos grasos denominados placas ateroescleróticas, que contienen colesterol, proteínas fibrosas, depósitos de calcio, plaquetas de la sangre y restos celulares. El establecimiento de una conexión entre la oclusión arterial (aterosclerosis) y los niveles de colesterol en sangre fue un proyecto del siglo XX que desencadenó una disputa que sólo se resolvió con el desarrollo de medicamentos efectivos en la disminución de los niveles de colesterol. El Framingham Heart Study es un estudio longitudinal, iniciado en 1948 y que continúa actualmente, destinado a identificar los factores correlacionados con la enfermedad cardiovascular. Unos 5.000 participantes de la ciudad de Framingham, Massachusetts, se sometieron a exámenes físicos periódicos y a encuestas de estilo de vida. En 2002 se incluyeron en el estudio participantes de la tercera generación. Este estudio monumental condujo a la identificación de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, entre los que se incluyen el tabaco, la obesidad, la inactividad física, la diabetes, presión sanguínea elevada y elevado colesterol en sangre.

En 1913, N.N. Anitschkov, un patólogo experimental de San Petersburgo, Rusia, publicó un estudio en el que demostraba que los conejos alimentados con una dieta rica en colesterol desarrollaban lesiones muy similares a las placas ateroscleróticas observadas en los humanos ancianos. Anitschkov continuó sus trabajos durante unas décadas más, publicando sus resultados en revistas occidentales importantes. No obstante, no se aceptó el trabajo como modelo de la aterosclerosis humana debido a la visión existente de que la enfermedad era una consecuencia simple



$R^1 = H$	$R^2 = H$	Compactina
$R^1 = CH_3$	$R^2 = CH_3$	Simvastatina (Zocor)
$R^1 = H$	$R^2 = OH$	Pravastatina (Pravachol)
$R^1 = H$	$R^2 = CH_3$	Lovastatina (Mevacor)

FIGURA 1 Las estatinas como inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Comparación de las estructuras del mevalonato y cuatro compuestos farmacéuticos que inhiben la HMG-CoA reductasa.

del envejecimiento por lo que no podía prevenirse. Sin embargo, la asociación entre colesterol sérico y aterosclerosis (la hipótesis lipídica) fue reforzándose gradualmente hasta que en la década de 1960 algunos investigadores sugirieron abiertamente que la intervención terapéutica podría ser útil. No obstante, la controversia persistió hasta que, en 1984, se publicaron los resultados de un gran estudio de disminución del colesterol, financiado por los National Institutes of Health de los EEUU: el Coronary Primary Prevention Trial. Este estudio demostró de manera concluyente una disminución estadísticamente significativa de los ataques de corazón e ictus como resultado de la disminución del nivel de colesterol. El estudio utilizó una resina de unión de ácidos biliares, la colestiramina, para controlar el colesterol. Los resultados propulsaron una investigación para disponer de intervenciones terapéuticas más efectivas. Aún persistió cierta controversia hasta el desarrollo de las estatinas hacia el final de la década de 1980 y principios de la de 1990.

RECUADRO 21-3 MEDICINA La hipótesis lipídica y el desarrollo de las estatinas (*continuación*)



Akira Endo
[Fuente: Cortesía de Akira Endo, Ph.D.]



Alfred Alberts
[Fuente: Merck Archives, Merck & Co., Inc. 2016]



P. Roy Vagelos
[Fuente: Cortesía de P. Roy Vagelos.]

El Dr. Akira Endo que trabajaba en la compañía Sankyo de Tokyo descubrió la primera estatina; el trabajo se publicó en 1976. Endo estaba interesado desde hacía algún tiempo en el metabolismo del colesterol y especuló, en 1971, que hongos que en aquel momento se estaban analizando para ver si contenían nuevos antibióticos podrían también contener un inhibidor de la síntesis del colesterol. En un período de varios años analizó más de 6.000 cultivos de hongos hasta que encontró un resultado positivo. El compuesto activo se denominó compactina (Fig. 1). Finalmente se comprobó que el compuesto era efectivo en la reducción de los niveles de colesterol en perros y monos; su trabajo captó la atención de Michael Brown y Joseph Goldstein de la Facultad de Medicina de la University of Texas-Southwestern. Brown y Goldstein empezaron a trabajar con Endo y confirmaron sus resultados. Algunos resultados espectaculares en los primeros ensayos clínicos limitados convencieron a varios laboratorios farmacéuticos a unirse en la búsqueda de estatinas. Un equipo de Merck liderado por Alfred Alberts y P. Roy Vagelos empezó a analizar cultivos de hongos encontrando un resultado positivo tan solo después de analizar 18 cultivos. La nueva estatina se denominó lovastatina (Fig. 1). El rumor de que la compactina, a dosis muy elevadas, era carcinogénica en perros casi hizo abandonar la carrera para el desarrollo de las estatinas en 1980, pero los beneficios para los pacientes con hipercolesterolemia familiar eran ya evidentes. Después de amplias consultas con expertos de todo el mundo y la Food and Drug Administration de los EEUU, Merck procedió a desarrollar la lovastatina con muchas precauciones. Pruebas exhaustivas realizadas en las dos décadas siguientes revelaron que ni la lovastatina ni ninguna de las demás estatinas de nuevas generaciones aparecidas desde entonces tenía efectos carcinogénicos.

Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa en parte por similitud con la estructura del mevalonato (Fig. 1) con lo que inhiben la síntesis del colesterol. El tratamiento con lovastatina reduce el colesterol sérico hasta en un 30% en individuos con hipercolesterolemia debida a tener una copia defectuosa del gen del receptor de la LDL. Cuando se combina con una resina administrada por vía oral que une ácidos bilizares e impide su reabsorción del intestino, el fármaco es aún más efectivo.

En el momento actual las estatinas son los medicamentos más utilizados para rebajar los niveles de colesterol sérico. Los efectos secundarios siempre preocupan con los fármacos pero en el caso de las estatinas muchos de los efectos secundarios son positivos. Estos medicamentos pueden mejorar el flujo sanguíneo, aumentan la estabilidad de las placas ateroescleróticas (con lo que no se rompen obstruyendo el flujo sanguíneo), reducen la agregación plaquetaria y reducen la inflamación vascular. Algunos de estos efectos tienen lugar antes de que disminuyan los niveles de colesterol en pacientes que toman estatinas por primera vez; puede que ello esté relacionado con una inhibición secundaria de la síntesis de isoprenoides por las estatinas. No todos los efectos de las estatinas son positivos. Unos pocos pacientes, normalmente entre los que toman estatinas en combinación con otros medicamentos que disminuyen el colesterol, experimentan dolor o debilidad muscular que puede convertirse en severa e incluso debilitante. Se ha observado un número más bien elevado de efectos secundarios en pacientes, si bien la mayoría son raros. No obstante, para la inmensa mayoría de personas la disminución de los riesgos asociados con la enfermedad coronaria debidos al uso de estatinas puede ser espectacular. Al igual que con todos los medicamentos, las estatinas deben utilizarse bajo prescripción y control del médico.

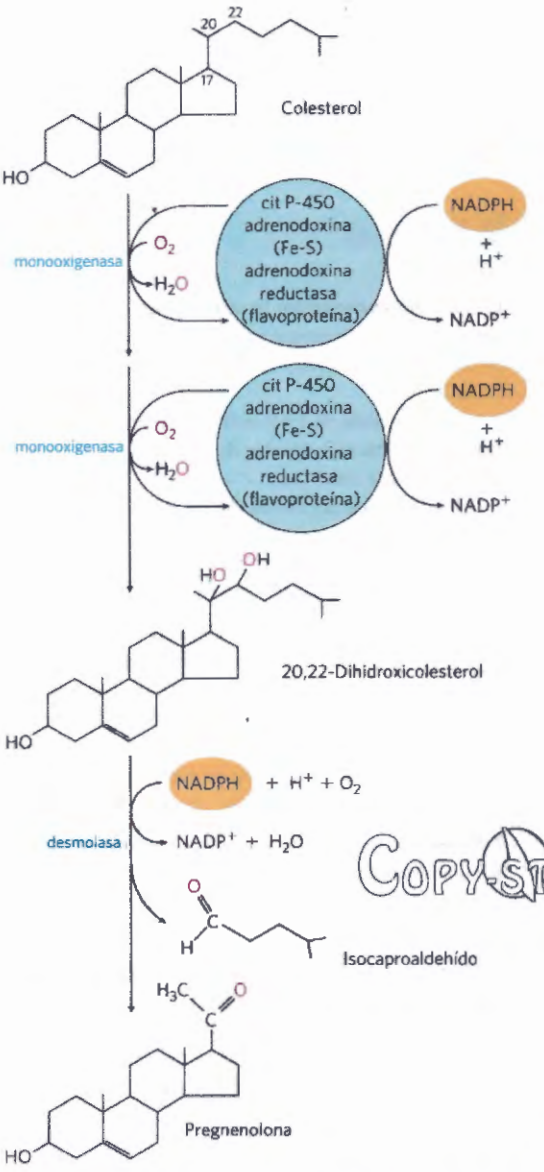


FIGURA 21-49 Corte de la cadena lateral en la síntesis de las hormonas esteroideas. El citocromo P-450 actúa como transportador de electrones en este sistema monooxigenasa que oxida carbonos adyacentes. El proceso también requiere las proteínas de transferencia de electrones adrenodoxina y adrenodoxina reductasa. Este sistema de corte de cadenas laterales se encuentra en las mitocondrias de la corteza suprarrenal, donde hay una producción muy activa de esteroides. La pregnenolona es el precursor de las restantes hormonas esteroideas (véase la Fig. 21-48).

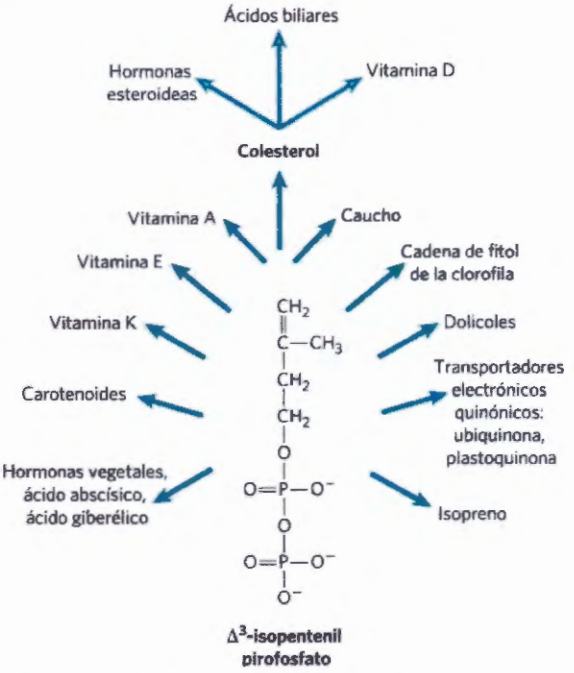


FIGURA 21-50 Visión general de la biosíntesis de isoprenoides. Las estructuras de la mayoría de productos finales mostrados se encuentran en el Capítulo 10.

sacáridos complejos, y la ubiquinona y la plastoquinona que son transportadores electrónicos en la mitocondria y los cloroplastos. En conjunto, todas estas moléculas son denominadas isoprenoides. En la naturaleza se han descubierto más de 20.000 moléculas isoprenoides diferentes, y otros cientos aparecen cada año.

La prenilación, unión covalente de un isoprenoide (véase la Fig. 27-36) es un mecanismo común por el que las proteínas son ancladas a la superficie interna de las membranas celulares de mamíferos (véase la Fig. 11-13). En alguna de estas proteínas el lípido unido es el grupo farnesilo de 15 carbonos; otras tienen el grupo geranilgeranilo de 20 carbonos. Diferentes enzimas unen los dos tipos de lípidos. Es posible que las reacciones de prenilación dirijan las proteínas a diferentes membranas según sea el lípido que se ha unido. La prenilación de proteínas es otro papel importante de los derivados isopreno de la ruta del colesterol.

COPY-STATION

RESUMEN 21.4 Biosíntesis de colesterol, esteroides e isoprenoides

- El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en una serie compleja de reacciones a través de los intermediarios β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA, mevalonato y dos isoprenos activados, el dimetilalil pirofosfato y el isopentenil pirofosfato. La condensación de unidades de isopreno produce el compuesto acíclico escualeno, que se cicla dando el sistema anular esteroideo y una cadena lateral.
- El colesterol y sus ésteres son transportados en la sangre en lipoproteínas plasmáticas. Las VLDL transportan colesterol, ésteres de colesterol y triacilgliceroles desde el hígado a otros tejidos, en donde los triacilgliceroles se degradan por la lipoproteína lipasa, convirtiéndose las VLDL en LDL. Las LDL, ricas en colesterol y sus ésteres, son captadas por endocitosis facilitada por receptor, en la que la apolipoproteína B-100 de la LDL es reconocida por receptores de la membrana plasmática.
- La síntesis y transporte del colesterol está bajo un complejo control por hormonas, concentraciones intracelulares de colesterol y nivel energético (concentración de AMP). La HMG-CoA reductasa está regulada alostéricamente y por modificación covalente. Además, tanto la velocidad de su síntesis como la de degradación

están controladas por un complejo de tres proteínas: Insig, SCAP y SREBP, que detectan los niveles de colesterol y desencadenan un incremento de la síntesis o de la degradación de la HMG-CoA reductasa. El número de receptores de LDL por célula también está regulado por el contenido en colesterol.

- Las condiciones dietéticas o defectos genéticos en el metabolismo del colesterol pueden conducir a ateroesclerosis y enfermedad cardíaca. En el transporte inverso de colesterol, la HDL elimina colesterol de los tejidos periféricos transportándolo al hígado. Al reducir el contenido en colesterol de las células espumosas, la HDL protege contra la ateroesclerosis.
- Las hormonas esteroideas (glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales) se forman a partir del colesterol por alteración de la cadena lateral e introducción de átomos de oxígeno en el sistema de anillos esteroideo. Además del colesterol existe una gran cantidad de compuestos isoprenoides derivados del mevalonato mediante condensaciones del isopentenil pirofosfato y el dimetilalil pirofosfato.
- La prenilación de ciertas proteínas las destina a asociarse con membranas celulares, lo que es esencial para su actividad biológica.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

malonil-CoA 805
acetil-CoA carboxilasa 805
ácido graso sintasa 806
proteína transportadora de acilos (ACP) 808
acil graso-CoA desaturasa 815
oxidasas de función mixta 815
estearil-ACP desaturasa (SCD) 815
ácidos grasos esenciales 815
oxigenasas de función mixta 816
citocromo P-450 816
prostaglandina 818
ciclooxigenasa (COX) 818
prostaglandina H_2 sintasa 818
tromboxano sintasa 819
tromboxano 819
leucotrieno 819
mediadores pro-resolutorios especializados (SPM) 819
glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 819
ciclo del triacilglicerol 822
gliceroneogénesis 829
tiazolidinadionas 829
fosfatidilserina 831
fosfatidilglicerol 831
fosfatidiletanolamina 833
cardiolipina 825
fosfatidilcolina 825
plasmalógeno 827
factor activador plaquetario 827
cerebrósido 828
esfingomielina 828
ganglиósido 828
isopreno 830
mevalonato 832
β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) 832
HMG-CoA sintasa 832
HMG-CoA reductasa 832
escualeno 833
ácidos biliares 834
ésteres del colesterol 836
apolipoproteínas 836
quilomicrón 836
ruta exógena 837
lipoproteína de densidad muy baja (VLDL) 837
lipoproteína de densidad baja (LDL) 837
ruta endógena 838
receptores de LDL 838
endocitosis facilitada por receptor 839
lipoproteína de densidad alta (HDL) 839
transporte inverso de colesterol 840
circulación enterohepática 840
proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles (SREBP) 841
proteína activadora de corte de SREBP 841
proteína génica inducida por insulina (Insig) 841
receptor de X hepático (LXR) 841
receptor de X retinoide (RXR) 842
ateroesclerosis 843
célula espumosa 843
estatina 843

Problemas

1. Ruta del carbono en la síntesis de ácidos grasos. Utilizando sus conocimientos sobre la biosíntesis de ácidos grasos dé una explicación para las siguientes observaciones experimentales:

(a) La adición de [^{14}C]acetil-CoA marcado de manera uniforme a una fracción soluble de hígado da palmitato marcado uniformemente con ^{14}C.

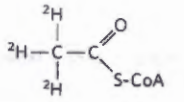
(b) Sin embargo, la adición de *pequeñas cantidades* de [^{14}C]acetil-CoA marcado uniformemente en presencia de un exceso de malonil-CoA sin marcar a una fracción soluble de hígado forma palmitato marcado sólo con ^{14}C en C-15 y C-16.

2. Síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa. Después de que una persona haya ingerido grandes cantidades de sacarosa, la glucosa y fructosa en exceso de sus requerimientos calóricos se transforman en ácidos grasos para la síntesis de triacilgliceroles. Esta síntesis de ácidos grasos consume acetil-CoA, ATP y NADPH: ¿Cómo se producen estas sustancias a partir de la glucosa?

3. Ecuación neta de la síntesis de ácidos grasos. Escriba la ecuación neta de la biosíntesis de palmitato en el hígado de rata, empezando con el acetil-CoA mitocondrial y NADPH, ATP y CO_2 citosólicos.

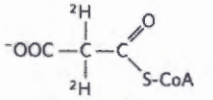
4. Ruta del hidrógeno en la síntesis de ácidos grasos. Considere una preparación que contiene todos los enzimas y cofactores necesarios para la biosíntesis de ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA añadidos.

(a) Si se añaden [2-^{2}H]acetil-CoA (marcado con deuterio, isótopo pesado del hidrógeno)



y un exceso de malonil-CoA sin marcar como sustratos, ¿cuántos átomos de deuterio se incorporarán en cada molécula de palmitato? ¿Cuáles serán sus localizaciones? Explíquelo.

(b) Si se añaden como sustratos acetil-CoA sin marcar y [2-^{2}H]malonil-CoA,



¿cuántos átomos de deuterio se incorporarán en cada molécula de palmitato? ¿Cuáles serán sus localizaciones? Explíquelo.

5. Energética de la β-cetoacil-ACP sintasa. En la reacción de condensación catalizada por la β-cetoacil-ACP sintasa (véase la Fig. 21-6) se sintetiza una unidad de cuatro carbonos por combinación de una unidad de dos carbonos y una de tres carbonos con liberación de CO_2. ¿Cuál es la ventaja termodiná-

COPYSTATION

mica de este proceso sobre uno que simplemente combine dos unidades de dos carbonos?

6. Modulación de la acetil-CoA carboxilasa. La acetil-CoA carboxilasa constituye el punto de regulación principal en la biosíntesis de ácidos grasos. Algunas de las propiedades del enzima se describen a continuación:

(a) La adición de citrato o isocitrato aumenta la V_{max} del enzima en un factor de hasta 10.

(b) El enzima existe en dos formas interconvertibles que difieren marcadamente en sus actividades:

$$\text{Protómero (inactivo)} \rightleftharpoons \text{polímero filamentoso (activo)}$$

El citrato y el isocitrato se fijan preferentemente a la forma filamentosa mientras que el palmitil-CoA se fija preferentemente al protómero.

Explique por qué estas propiedades están de acuerdo con el papel regulador de la acetil-CoA carboxilasa en la biosíntesis de ácidos grasos.

7. Paso de los grupos acetilo a través de la membrana mitocondrial interna. El grupo acetilo del acetil-CoA, producido por la descarboxilación oxidativa del piruvato en la mitocondria, se transfiere al citosol por la lanzadera del grupo acetilo descrita en la Figura 21-10.

(a) Escriba la ecuación global para la transferencia de un grupo acetilo desde la mitocondria al citosol.

(b) ¿Cuál es el coste de este proceso en ATP por grupo acetilo?

(c) En el Capítulo 17 encontramos una lanzadera de grupo acilo en la transferencia de acil graso-CoA desde el citosol a la mitocondria en preparación de su β oxidación (véase la Fig. 17-6). Un resultado de tal lanzadera es la separación de los fondos de CoA mitocondrial y citosólico. ¿Se cumple esto también con la lanzadera del grupo acetilo? Explíquelo.

8. Necesidades de oxígeno de las desaturasas. La biosíntesis del palmitoleato (véase la Fig. 21-12), ácido graso insaturado común con un doble enlace cis en la posición D^9, utiliza palmitato como precursor. ¿Puede tener lugar la síntesis de palmitoleato en condiciones estrictamente anaeróbicas? Explíquelo.

9. Coste energético de la síntesis de triacilgliceroles. Utilice una ecuación neta para la biosíntesis de tripalmitilglicerol (tripalmitina) a partir de glicerol y palmitato para demostrar cuántos ATP se requieren por molécula de tripalmitina formada.

10. Recambio de triacilgliceroles en el tejido adiposo. Cuando se añade [^{14}C]glucosa a la dieta equilibrada de ratas adultas no se produce incremento en la cantidad de triacilgliceroles almacenados a pesar de que los triacilgliceroles quedan marcados con [^{14}C]. Explíquelo.

11. Coste energético de la síntesis de fosfatidilcolina. Escriba la secuencia de pasos y la reacción neta para la biosíntesis de fosfatidilcolina por la ruta de recuperación a partir de oleato, palmitato, dihidroxiacetona fosfato y colina. Empezando con estos precursores, ¿cuál es el coste (en número de ATP) de la síntesis de fosfatidilcolina por la ruta de recuperación?

12. Ruta de recuperación para la síntesis de fosfatidilcolina. Una rata joven mantenida con una dieta deficiente en metionina no sobrevive a menos que se le incluya colina en la dieta. Explíquelo.

13. Síntesis de isopentenil pirofosfato. Si se añade 2 [^{14}C] acetil-CoA a un homogenado de hígado de rata que está sintetizando colesterol, ¿en dónde aparecerá la marca de ^{14}C en el Δ^3-isopentenil pirofosfato, la forma activada de una subunidad de isopreno?

14. Dadores activados en la síntesis de lípidos. En la biosíntesis de lípidos complejos, los componentes se unen mediante transferencia del grupo adecuado a partir de un dador activado. Por ejemplo, el dador activado de grupos acetilo es el acetil-CoA. Para cada uno de los grupos siguientes, indique la forma del dador activado: (a) fosfato; (b) D-glucosilo; (c) fosfoetanolamina; (d) D-galactosilo; (e) acilo graso; (f) metilo; (g) el grupo de dos carbonos de la síntesis de ácidos grasos; (h) D^3-isopentenilo.

15. Importancia de las grasas en la dieta. Cuando se someten ratas jóvenes a una dieta totalmente libre de grasas crecen poco, desarrollan dermatitis escamosa, pierden el pelo, y mueren pronto, síntomas que pueden evitarse si se incluye en la dieta linoleato o materia vegetal. ¿Qué es lo que hace que el linoleato sea un ácido graso esencial? ¿Por qué la materia vegetal es un sustituto?

16. Regulación de la biosíntesis de colesterol. El colesterol en humanos se puede obtener de la dieta o ser sintetizado de novo. Un humano adulto que siga una dieta baja en colesterol sintetiza normalmente 600 mg de colesterol por día en el hígado. Si la cantidad de colesterol en la dieta es grande, la síntesis de novo del colesterol se reduce drásticamente. ¿Cómo se da esta regulación?

17. Disminución de los niveles séricos de colesterol con estatinas Los pacientes tratados con un fármaco del grupo de las estatinas muestran, generalmente, una disminución espectacular del colesterol sérico. Sin embargo, la cantidad del enzima HMG-CoA reductasa presente en las células puede aumentar de manera sustancial. Sugiera una explicación para este efecto.

18. Función de los ésteres tiólicos en la biosíntesis del colesterol Dibuje un mecanismo para cada una de las tres reacciones que se muestran en la Figura 21-34, detallando la ruta de síntesis del mevalonato a partir de acetil-CoA.

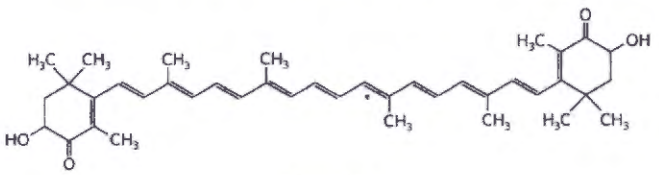
19. Efectos secundarios potenciales del tratamiento con estatinas Aunque aún no se han realizado ensayos clínicos que documenten los beneficios o efectos secundarios, algunos médicos han sugerido que los pacientes tratados con estatinas tomen también un suplemento de coenzima Q. Sugiera las razones de esta recomendación.

Problema de análisis de datos

20. Modificación genética de *E. coli* para producir grandes cantidades de isoprenoide En la naturaleza existe una enorme variedad de isoprenoides, algunos de los cuales son importantes médica o comercialmente y que se producen a escala industrial. Entre los métodos de producción se incluyen la síntesis enzimática in vitro que es un proceso caro y con un bajo rendimiento. En 1999, Wang, Oh y Liao publicaron sus experimentos para modificar genéticamente la bacteria *E. coli*, de fácil de cultivo, para producir grandes cantidades de astaxantina, un isoprenoide de importancia comercial.

La astaxantina es un pigmento carotinoide (un antioxidante) de color rojo anaranjado producido por algas marinas.

Animales marinos tales como las gambas, langostas y algunos peces que se alimentan de algas obtienen su color anaranjado de la astaxantina ingerida. La astaxantina está compuesta de ocho unidades de isopreno; su fórmula molecular es $C_{40}H_{52}O_4$:



Astaxantina

(a) Señale con círculos las ocho unidades isopreno de la molécula de astaxantina. Pista: Utilice los grupos metilo salientes como guía.

La astaxantina se sintetiza a través de la ruta que se muestra en la página siguiente, empezando con Δ^3-isopentenil pirofosfato (IPP). Los pasos ❶ y ❷ se muestran en la Figura 21-36 y la reacción catalizada por la IPP isomerasa se muestra en la Figura 21-35.

(b) En el paso ❹ de la ruta, se unen dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato formando fitoeno. ¿Es ésta una unión cabeza-cabeza o cabeza-cola? (Véase la Figura 21-36 para detalles).

(c)Describa brevemente la transformación química del paso ❺.

(d) En la síntesis del colesterol (Fig. 21-37) se produce una ciclación (cierre de anillos) en la que hay una oxidación neta por O_2. ¿La ciclación en el paso ❻ de la ruta sintética de la astaxantina requiere una oxidación neta del sustrato (licopeno)? Explique su razonamiento.

E. coli no produce grandes cantidades de muchos isoprenoides y no sintetiza astaxantina. Se sabe que sintetiza pequeñas cantidades de IPP, DMAPP, geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato y geranilgeranil pirofosfato. Wang y colaboradores clonaron diversos genes de *E. coli* que codifican enzimas necesarios para la síntesis de astaxantina en plásmidos que permiten su sobreexpresión. Entre estos genes se cuentan *idi*, que codifica la IPP isomerasa e *ispA* que codifica una prenil transferasa que cataliza los pasos ❶ y ❷.

Ver gráfico en página siguiente

Para modificar genéticamente un *E. coli* que sea capaz de la ruta completa de la astaxantina, Wang y colaboradores clonaron diversos genes de otras hacterias en plásmidos que permitiesen la sobreexpresión en *E. coli*. Entre estos genes se encontraban *crtE* de *Erwinia uredovora*, que codifica un enzima que cataliza el paso ❸ y *crtB, crtI, crtY, crtZ y crtW* de *Agrobacterium aurantiacum*, que codifican los enzimas de los pasos ❹, ❺, ❻, ❼, ❺ y ❽ respectivamente.

Los investigadores también clonaron el gen *gps* de *Archaeoglobus fulgidus*, sobreexpresaron este gen en *E. coli* y extrajeron el producto génico. Cuando se hizo reaccionar este extracto con [^{14}C]IPP y DMAPP, o geranil pirofosfato o farnesil pirofosfato, sólo se produjo, en todos los casos, geranilgeranil pirofosfato marcado con ^{14}C.

Basándose en estos datos, qué paso o pasos de la ruta están catalizados por el enzima codificado en *gps*? Razone su respuesta.

Wang y colaboradores prepararon seguidamente varias cepas de *E. coli* que sobreexpresaban diferentes genes y midieron el color naranja de las colonias (las colonias de tipo salvaje de *E. coli* son de color hueso) y la cantidad de astaxantina producida (medida por su color naranja). Estos resultados se muestran a continuación (ND indica no determinado).

Cepa	Gen(es) sobreexpresado(s)	Color naranja	Rendimiento de astaxantina (μg/g de peso seco)
1	*crtBIZYW*	–	ND
2	*crtBIZYW*, *ispA*	–	ND
3	*crtBIZYW*, *idi*	–	ND
4	*crtBIZYW*, *idi*, *ispA*	–	ND
5	*crtBIZYW*, *crtE*	+	32,8
6	*crtBIZYW*, *crtE*, *ispA*	+	35,3
7	*crtBIZYW*, *crtE*, *idi*	+ +	234,1
8	*crtBIZYW*, *crtE*, *idi*, *ispA*	+ + +	390,3
9	*crtBIZYW*, *gps*	+	35,6
10	*crtBIZYW*, *gps*, *idi*	+ + +	1.418,8

COPY-STATION

Si compara los resultados de las cepas 1 a 4 con los de las cepas 5 a 8, ¿qué puede concluir sobre el nivel de expresión de un enzima capaz de catalizar el paso ❸ de la ruta sintética de la astaxantina en *E. coli* de tipo salvaje? Razone la respuesta.

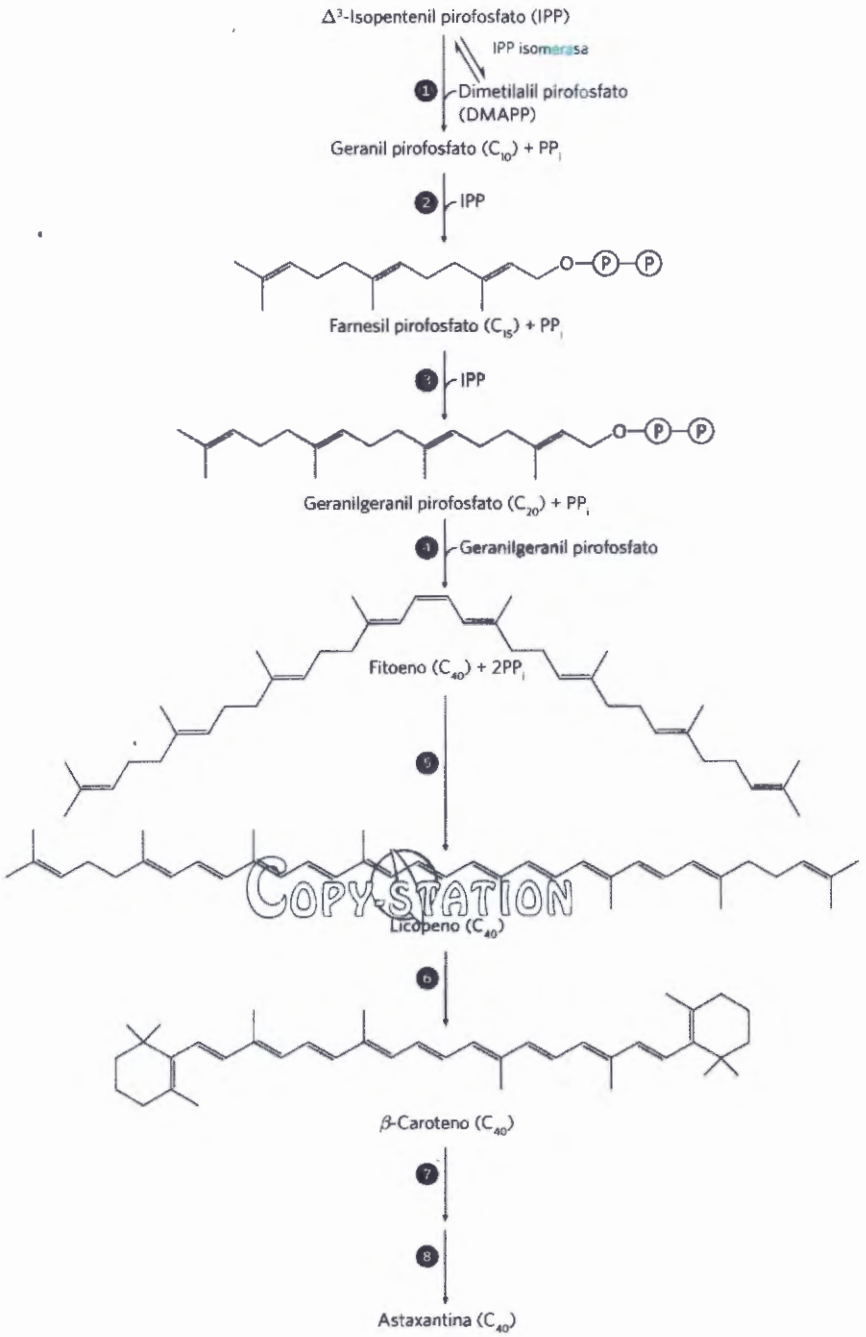
Basándose en los datos anteriores, ¿cuál es el enzima limitante de velocidad de la ruta, la IPP isomerasa o el enzima codificado en *idi*? Explíquelo.

¿Esperaría que una cepa con sobreexpresión de *crtBIZYW*, *gps* y *crtE* produjese niveles de astaxantina bajos (+), medios (++) o altos (+++) según las medidas de la coloración naranja? Explíquelo.

Referencias

Wang, C.-W., M.-K. Oh, and J.C. Liao. 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62:235–241.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e



COPY-STATION

CAPÍTULO 22

Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

22.1 **Visión general del metabolismo del nitrógeno** 854

22.2 **Biosíntesis de los aminoácidos** 863

22.3 **Moléculas derivadas de aminoácidos** 875

22.4 **Biosíntesis y degradación de nucleótidos** 882

Copy-station

El nitrógeno se halla tan sólo por detrás del carbono, el hidrógeno y el oxígeno por su contribución a la masa de los seres vivos. La mayor parte de este nitrógeno forma parte de aminoácidos y nucleótidos. En este capítulo estudiamos todos los aspectos del metabolismo de los compuestos que contienen nitrógeno, excepto el catabolismo de los aminoácidos, descrito en el Capítulo 18.

La exposición conjunta de las rutas biosintéticas que conducen a la formación de los aminoácidos y los nucleótidos está justificada no sólo porque ambas clases de moléculas contienen nitrógeno (que procede de fuentes biológicas comunes), sino también porque los dos conjuntos de vías están considerablemente interconectados, con varios intermediarios clave comunes. Ciertos aminoácidos, o partes de aminoácidos, se incorporan a la estructura de las purinas y de las pirimidinas, y en un caso parte de un anillo de purina se incorpora a la estructura de un aminoácido (la histidina). Los dos conjuntos de vías metabólicas también comparten buena parte de sus características químicas, en especial la preponderancia de las reacciones de transferencia de nitrógeno o de grupos monocarbonados.

Las vías que se describen aquí pueden intimidar al estudiante que se inicie en el estudio de la bioquímica. Su complejidad proviene no tanto de los propios procesos químicos, que en general se comprenden bien, sino del gran número de pasos y de la variedad de los intermediarios. La mejor manera de abordar estas vías consiste en no perder de vista los principios metabólicos ya discutidos, los precursores e intermediarios clave y los tipos comunes de reacciones que tienen lugar. Incluso un rápido repaso de la química puede resultar útil, pues algunas de las transformaciones químicas menos habituales de los sistemas biológicos se encuentran en estas vías metabólicas; así, encontramos ejemplos destacados del uso biológico poco habitual de los metales molibdeno, selenio y vanadio. El esfuerzo realizado tiene su recompensa, especialmente para los estudiantes de medicina o veterinaria. Muchas enfermedades genéticas descritas en humanos y animales son debidas a la ausencia de uno o más enzimas del metabolismo de aminoácidos y nucleótidos y muchos fármacos utilizados comúnmente para combatir enfermedades infecciosas son inhibidores de enzimas de estas vías, así como muchos de los agentes más importantes en la quimioterapia del cáncer.

La regulación es crucial en la biosíntesis de los compuestos que contienen nitrógeno. Puesto que los aminoácidos y los nucleótidos se requieren en cantidades relativamente pequeñas, el flujo metabólico a través de la mayoría de estas vías no tiene la magnitud del flujo biosintético de las vías de los glúcidos o de las grasas en los tejidos animales. Pero, puesto que los aminoácidos y los nucleótidos deben fabricarse en proporciones correctas y a un ritmo adecuado para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, sus vías biosintéticas deben estar reguladas y coordinadas entre sí de forma precisa. Las concentraciones de aminoácidos y nucleótidos, que son moléculas cargadas, también tienen que regularse para mantener el balance electroquímico de la célula. Tal como se ha comentado en capítulos anteriores, las vías metabólicas pueden estar reguladas tanto por cambios en la actividad como por la cantidad disponible de enzimas específicos. Las vías que se presentan en este capítulo proporcionan algunos de los ejemplos mejor conocidos de regulación de la actividad enzimáti-

ca. El control de las *cantidades* de los diferentes enzimas en una célula (es decir, de su síntesis y degradación) se trata en el Capítulo 28.

22.1 Visión general del metabolismo del nitrógeno

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y a los nucleótidos comparten la necesidad de nitrógeno. Por lo general, los compuestos de nitrógeno solubles y utilizables biológicamente escasean en el entorno natural. Por este motivo, la mayor parte de organismos mantienen una estricta economía en el uso del amoníaco, los aminoácidos y los nucleótidos. Veremos, en efecto, que los aminoácidos, las purinas y las pirimidinas, libres formados durante el recambio metabólico de proteínas y ácidos nucleicos, a menudo se recuperan y reutilizan. En primer lugar examinaremos las vías por las que se introduce el nitrógeno del medio en los sistemas biológicos.

El ciclo del nitrógeno mantiene una reserva de nitrógeno disponible biológicamente

La fuente más abundante de nitrógeno es el aire, que en sus cuatro quintas partes es nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, relativamente pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables por los organismos vivos. En la biosfera, los procesos metabólicos de las diferentes especies actúan de forma interdependiente para recuperar y reutilizar el nitrógeno disponible biológicamente en un vasto **ciclo del nitrógeno (Fig. 22-1)**. El primer paso del ciclo consiste en la **fijación** (reducción) del nitrógeno atmosférico por bacterias fijadoras de nitrógeno que proporcionan amoníaco (NH_3 o NH_4^+). Aunque el amoníaco puede ser utilizado por la mayor parte de los organismos vivos, las bacterias del suelo, que obtienen su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2^-) y finalmente a nitrato (NO_3^-), son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoníaco que llega al suelo se oxida a nitrato. Este proceso se conoce como **nitrificación**. Las plantas y muchas bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente nitrato y nitrito a amonioaco por acción de las nitrato y nitrito reductasas. Las plantas incorporan el amoníaco así formado en forma de aminoácidos. Los animales a su vez usan las plantas como fuente de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, para fabricar sus proteínas. Cuando los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo en donde bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo en nitrito y nitrato. Se mantenido el equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico por las bacterias que convierten el nitrato en N_2 en condiciones anaeróbicas, proceso denominado **desnitrificación** (Fig. 22-1). Estas bacterias del suelo utilizan NO_3^- en lugar de O_2 como aceptor final de electrones en una serie de reacciones que (al igual que la fosforilación oxidativa) generan un gradiente protónico transmembrana, que se aprovecha para sintetizar ATP.

El ciclo del nitrógeno es cortocircuitado por un grupo de bacterias que llevan a cabo la oxidación anaerobia del amoníaco, o **anamox**, (Fig. 22-1), proceso que convierte amoníaco y nitrito en N_2. Puede que entre el

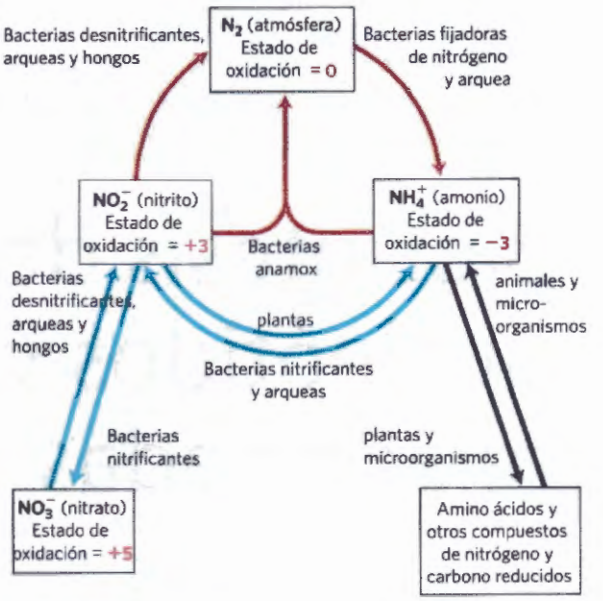


FIGURA 22-1 El ciclo del nitrógeno. La cantidad total de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera excede los 10^{11} kg. Las reacciones indicadas con flechas rojas tienen lugar principal o enteramente en medios anaerobios.

50% y el 70% de la conversión del NH_3 a N_2 en la biosfera transcurra a través de este proceso, que no se detectó hasta la década de 1980. Los anaerobios obligados que realizan la anamox son microorganismos fascinantes que pueden proporcionar algunas soluciones eficaces para los problemas de tratamiento de residuos (Recuadro 22-1).

Examinamos a continuación el proceso que genera el amoníaco que se incorpora en los microorganismos, plantas y animales que los consumen.

Más del 90% del NH_4^+ generado por las plantas vasculares, las algas y los microorganismos procede de la asimilación de nitrato, un proceso en dos etapas. Primero, el NO_3^- se reduce a NO_2^- por la **nitrato reductasa**, a continuación el NO_2^- es reduce a NH_4^+ en una trasferencia de seis electrones catalizada por la **nitrito reductasa (Fig. 22-2)**. Ambas reacciones ponen en juego cadenas de transportadores de electrones y cofactores que aún no se han identificado. La nitrato reductasa es una proteína soluble de gran tamaño (M_r 220.000). En el enzima, un par de electrones cedidos por el NADH fluye a través de grupos —SH de la cisteína, FAD y un citocromo (cyt b_{557}), y a continuación, a través de un nuevo cofactor que contiene molibdeno antes de reducir el sustrato NO_3^- a NO_2^-

La nitrito reductasa de las plantas se encuentra en los cloroplastos y recibe sus electrones de la ferredoxinaa (que se reduce en las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis; véase la Sección 19.8). Seis electrones, cedidos uno a uno por la ferredoxina, pasan a través de un centro 4S-4Fe del enzima, a continuación a través de una nueva molécula tipo hemo (sirohemo) antes de reducir el NO_2^- a NH_4^+ (Figura 22-2). En los microbios no fotosintéticos, el NADPH suministra los electrones para esta reacción.

La actividad humana representa una amenaza creciente para el balance global del nitrógeno, y para

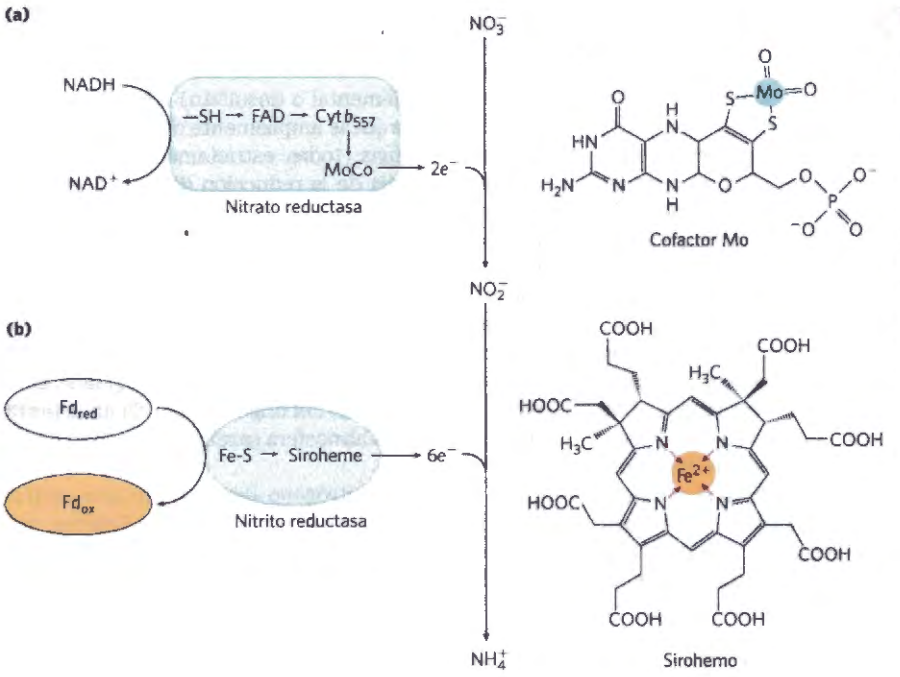


FIGURA 22-2 Asimilación del nitrato por la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. (a) Las nitrato reductasas de plantas y bacterias catalizan la reducción con dos electrones del NO_3^- a NO_2^-, en la queun nuevocofactor con Mo juega un papel central. El NADH es el dador de electrones. **(b)** La nitrito reductasa convierte el producto de la nitrato reductasa en NH_4^+ en un proceso de transferencia de seis electrones y ocho protones, en el que el centro metálico de sirohemo transporta electrones y los grupos carboxilo del sirohemo pueden ceder protones. La fuente inicial de electrones es la ferredoxina reducida.

todas las formas de vida que dependen de este balance. El nitrógeno fijado usado en la agricultura, principalmente en forma de fertilizantes, actualmente aporta tanto amoniaco y otras especies reactivas de nitrógeno a la biosfera como hacen los procesos naturales, y la actividad industrial libera nitrógeno reactivo adicional en la atmósfera. El control de los efectos nocivos de las actividades agrícolas y de los contaminantes industriales seguirá siendo un aspecto importante del esfuerzo para aumentar el suministro de alimentos para una población humana en expansión.

Enzimas del complejo de la nitrogenasa fijan el nitrógeno

La disponibilidad de nitrógeno fijado, un nutriente esencial, puede haber limitado el tamaño de la biosfera primordial. A medida que las células primitivas adquirieron la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, la biosfera se expandió. Se han encontrado evidencias de fijación biológica de nitrógeno en rocas sedimentarias de más de 3000 millones de amtigüedad.

En la actualidad sólo algunas bacterias y arquebacterias pueden fijar el N_2 atmosférico. Estos organismos, llamados diazótrofos, incluyen las cianobacterias del suelo y de las aguas dulces y saladas, las arquea metanogénicas (anaerobios estrictos que obtienen energía y carbono convirtiendo H_2 y CO_2 en metano), otros tipos de bacterias del suelo, tales como algunas especies de *Azotobacter*, y las bacterias fijadoras de nitrógeno que viven como **simbiontes** en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas. El primer producto importante de la fijación del nitrógeno es el amoníaco, que puede ser utilizado por todos los organismos, ya sea directamente o tras su conversión en otros compuestos solubles, tales como nitritos, nitratos o aminoácidos.

La reducción del nitrógeno a amoníaco es una reacción exergónica:

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3 \qquad \Delta G'^\circ = -33{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Sin embargo, el triple enlace N≡N es muy estable, con una energía de enlace de 930 kJ/mol. La fijación del nitrógeno tiene, por tanto, una energía de activación extremadamente alta que hace que el nitrógeno atmosférico sea prácticamente inerte en condiciones normales. El amoníaco se produce industrialmente por el procedimiento de Haber (llamado así porque su descubridor fue Fritz Haber), que requiere temperaturas entre 400 y 500 °C y presiones de nitrógeno e hidrógeno de decenas de miles de kilopascales (varios centenares de atmósferas) para conseguir la energía de activación necesaria. Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno tiene lugar a temperaturas biológicas y a 0,8 atm de nitrógeno, por lo que la elevada barrera de activación debe superarse por otros medios. Esto se consigue, al menos en parte, por la unión y la hidrólisis del ATP. La reacción global puede escribirse así

$$N_2 + 10H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_4^+ + 16ADP + 16P_i + H_2$$

La fijación biológica de nitrógeno se realiza por un complejo de proteínas muy conservado, denominado **complejo de la nitrogenasa**; sus componentes clave son la **dinitrogenasa reductasa** y la **dinitrogenasa (Fig. 22-3a)**. La dinitrogenasa reductasa (M_r 60.000) es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Contiene un único centro redox del tipo 4Fe-4S (véase la Fig. 19-5), unido entre las subunidades, que puede ser oxidado y reducido por un electrón. Tiene también dos sitios de unión de ATP/ADP (un sitio en cada subunidad). La dinitrogensa (M_r 240.000) es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ que contiene dos cofactores con Fe que transfieren electrones (Fig. 22-3b). Uno de ellos, el **agregado P**, tiene un par de centros 4Fe-4S, que comparten un átomo de azufre, formando un centro 8Fe-7S. El segundo cofactor de la dinitrogenasa, el **cofactor FeMo**, es una nueva estructura compuesta de 7 átomos de Fe, 9 átomos de S inorgánico, una cadena lateral de Cys y un único átomo

RECUADRO 22-1 Estilos de vida poco comunes de lo invisible pero abundante

En nuestra cualidad de aerobios, fácilmente podemos pasar por alto las bacterias y arqueas que prosperan en medios anaeróbicos. Aunque raramente considerados en los textos de bioquímica general, estos organismos representan una gran parte de la biomasa del planeta, y su contribución al balance del carbono y el nitrógeno en la biosfera es esencial para todas las formas de vida.

Tal como se ha analizado en capítulos anteriores, la energía necesaria para el mantenimiento de los sistemas vivientes depende de la generación de gradientes de protones a través de membranas. Los electrones procedentes de un sustrato reducido son transferidos sucesivamente a una serie de transportadores de electrones en las membranas pasan a través de una serie de transferencias de electrones hasta un aceptor final de electrones. Los protones son un producto secundario de este proceso que se acumulan a un lado de la membrana, generando un gradiente de protones transmembrana. El gradiente de protones se utiliza para sintetizar ATP o para impulsar otros procesos que requieren energía. Para todos los eucariotas, el sustrato reducido es generalmente un glúcido (glucosa o piruvato) o un ácido graso y el aceptor de electrones el oxígeno.

Muchas bacterias y arquea son mucho más versátiles. En medios anaeróbicos, como los sedimentos marinos o de agua dulce, la variedad de estrategias vitales es extraordinaria. Prácticamente cualquier par redox puede ser una fuente de energía para algún organismo o grupo de organismos especializado. Por ejemplo, un gran número de bacterias litótrofas (un litótrofo es un quimiótrofo que utiliza fuentes de energía inorgánicas; véase la Fig. 1-5) poseen una hidrogenasa que utiliza hidrógeno molecular para reducir el NAD^+:

$$H_2 + NAD^+ \xrightarrow{\text{hidrogenasa}} NADH + H^+$$

El NADH es una fuente de electrones para diversos aceptores de electrones unidos a membrana y genera el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. Otros litótrofos oxidan compuestos de azufre (H_2S, azufre elemental o tiosulfato) o hierro ferroso. Un grupo de arqueas ampliamente distribuido llamadas metanógenas, todas estrictamente anaerobias, obtienen energía de la reducción del CO_2 a metano. Esta es sólo una pequeña muestra de lo que los organismos anaeróbicos son capaces de hacer para prosperar. Sus rutas metabólicas están repletas de reacciones interesantes y de cofactores altamente especializados desconocidos en nuestro mundo de aerobios obligados. El estudio de estos organismos puede procurar resultados prácticos. También puede ayudar a la comprensión del origen de la vida en la tierra primitiva, en una atmósfera carente de oxígeno molecular.

El ciclo del nitrógeno depende de una amplia variedad de bacterias especializadas. Existen dos grupos de bacterias nitrificantes: las que oxidan el amoníaco a nitritos y las que oxidan los nitritos resultantes a nitratos (véase la Fig. 22-1). Después del O_2, el nitrato es el segundo aceptor de electrones biológico más utilizado, y muchas bacterias y arquea pueden catalizar la desnitrificación de los nitratos a nitrógeno, que a continuación las bacterias fijadoras de nitrógeno convierten de nuevo en amoníaco. El amoníaco es uno de los principales contaminantes de las aguas residuales y de los residuos de las granjas de animales y es un producto secundario de la industria de los fertilizantes y del refinado del petróleo. Las plantas de tratamiento de residuos utilizan generalmente comunidades de bacterias nitrificantes y desnitrificantes para convertir el amoníaco en nitrógeno atmosférico. El proceso es caro y requiere carbono orgánico y oxígeno.

En las décadas de 1960 y 1970 aparecieron algunos artículos científicos que sugerían que el amoníaco podía oxidarse a nitrógeno anaeróbicamente, utilizando nitrito como aceptor de electrones; este proceso se denominó anamox. Estos resultados recibieron poca atención hasta que las bacterias que realizan este proceso fueron descubiertas en una instalación de tratamiento de desechos en Delft, Holanda, a mediados de la década de 1980. Un equipo de

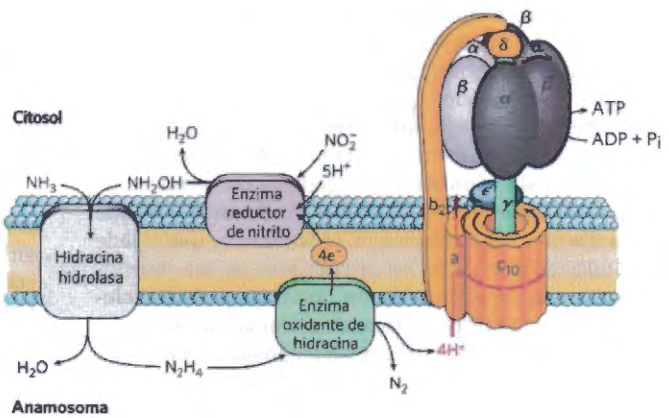


FIGURA 1 Las reacciones anamox. El amoníaco y la hidroxilamina se convierten en hidracina y H_2O por la hidracina hidroxilasa y la hidracina es oxidada por el enzima oxidante de hidracina, generando N_2 y protones. Los protones generan un gradiente de protones para la síntesis de ATP. En el exterior del anamosoma, se usan los protones por el enzima reductor de nitritos, produciendo hidroxilamina con lo que se cierra el ciclo. Todos los enzimas anamox están contenidos en la membrana del anamosoma.

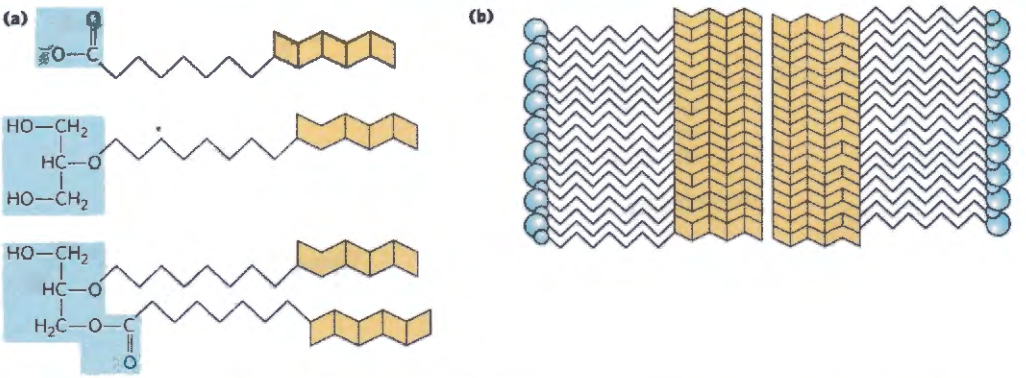


FIGURA 2 **(a)** Lípidos laderanos de la membrana del anamosoma. Se desconoce el mecanismo de síntesis del anillo de ciclobutano inestable. **(b)** Los laderanos pueden apilarse para formar una estructura de membrana muy densa, impermeable e hidrofóbica, que permite el secuestro de la hidracina producida en las reacciones anamox.

microbiólogos holandeses, liderado por Gijs Kuenen and Mike Jetten, empezó a estudiar estas bacterias, que pronto fueron identificadas como pertenecientes a un filum bacteriano poco común, los Plantomicetos. Seguirían algunos resultados sorprendentes.

La bioquímica del proceso anamox fue descubriéndose poco a poco (Fig. 1). La hidracina (N_2H_4), una molécula muy reactiva, utilizada como combustible para cohetes, fue un intermediario inesperado. La hidracina, como molécula pequeña, es a la vez muy tóxica y difícil de almacenar. Difunde rápidamente a través de las membranas fosfolipídicas. Las bacterias anamox resuelven este problema secuestrando la hidracina en un orgánulo especializado, denominado **anamoxoma**. La membrana de este orgánulo está compuesta de lípidos conocidos como **laderanos** (Fig. 2), nunca antes encontrados en ningún organismo. Los anillos fusionados de ciclobutano de los laderano se apilan formando una barrera muy densa que dificulta notablemente la liberación de hidracina. Los anillos de ciclobutano se encuentran bajo tensión y son difíciles de sintetizar; aún no se conoce el mecanismo bacteriano para la síntesis de estos lípidos.

El descubrimiento del anamosoma fue sorprendente. Las células bacterianas generalmente no poseen compartimientos y la falta de un núcleo limitado por una membrana se considera a menudo como la distinción fundamental entre los eucariotas y las bacterias. La presencia de orgánulos en una bacteria ya es de por sí suficientemente destacable, pero los plantomicetos también tienen un núcleo: su DNA cromosómico se encuentra en el interior de una membrana (Fig. 3). El descubrimiento de esta organización subcelular ha impulsado la investigación para localizar el origen de los plantomicetos y la evolución del núcleo eucariótico. Los plantomicetos son una línea bacteriana antigua con múltiples géneros, tres de los cuales realizan las reacciones anamox. El estudio continuado de este grupo puede acercarnos a un objetivo clave de la biología evolutiva: la descripción del organismo afectuosamente denominado LUCA, el último antepasado común universal de todas las formas de vida de nuestro planeta.

Por el momento, las bacterias anamox representan un avance fundamental en el tratamiento de residuos, reduciendo el coste de la eliminación del amoníaco en un 90% (se suprimen por completo las etapas de desnitrificación tradicionales y los costes de aireación asociados a la nitrificación son menores) y la liberación de productos secundarios contaminantes. Claramente, una mayor familiaridad con las potencialidades de las bacterias para la biosfera puede resultar rentable a la hora de afrontar los desafíos ambientales de siglo XXI.



FIGURA 3 Microfotografía electrónica de transmisión de una sección transversal de *Gemmata obscurigiobus*, que muestra el DNA en un núcleo (N) con envoltura nuclear (NE). Las bacterias del género *Gemmata* (Filum Planctomicetos) no realizan reacciones anamox.

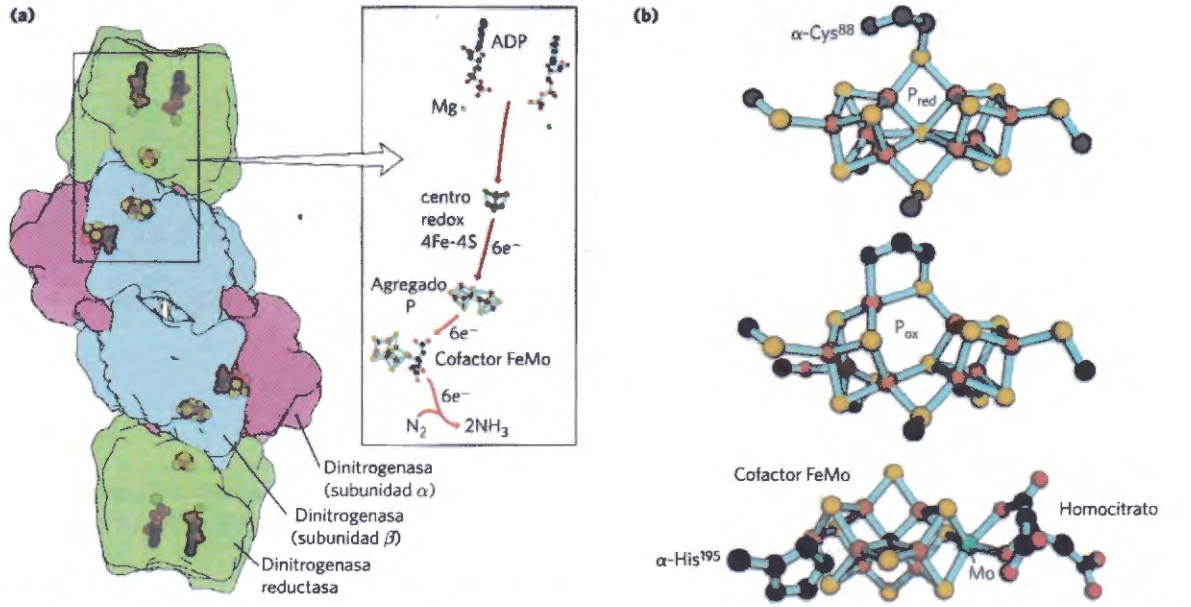


FIGURA 22-3 Enzimas y cofactores del complejo de la nitrogenasa. (PDB ID 1FP6 y PDB ID 1MIN) **(a)** El holoenzima consiste en dos moléculas idénticas de dinitrogenasa reductasa (verde), cada una con un centro redox 4Fe-4S y sitios de unión para dos ATP y dos heterodímeros de dinitrogenasa (púrpura y azul), cada uno con un agregado P (centro Fe-S) y un cofactor FeMo. En esta estructura el ADP está unido al sitio ATP para mejorar la estabilidad del cristal. **(b)** Cofactores de transferencia de electrones. El agregado AP se muestra aquí en sus formas reducida (arriba) y oxidada (en medio). El cofactor FeMo (abajo) posee un átomo de Mo con tres ligandos S, un ligando His y dos ligandos oxígeno de una molécula de homocitrato. En algunos organismos, un átomo de vanadio substituye al átomo de Mo (el Fe se muestra en naranja y el S en amarillo). [Fuentes: **(a)** PDB ID 1N2C, H. Schindelin et al., *Nature* 387:370, 1997. **(b)** Pred : PBD ID 3 MIN, and Pox: PBD ID 2 MIN, J.W. Peters et al., *Biochemistry* 36:1181, 1997; FeMo cofactor PDB ID 1MIN, O. Einsle et al., *Science* 297:1696, 2002.]

de carbono en el centro del agregado FeS. Un átomo de molibdeno también forma parte del cofactor, con ligandos que incluyen tres átomos de S inorgánico, una cadena lateral de His y dos átomos de oxígeno de una molécula de homocitrato, que es parte esencial del cofactor FeMo. También hay una forma de nitrogenasa que contiene vanadio en lugar de molibdeno mientras que algunas especies de bacterias pueden producir ambos tipos. El enzima que contiene vanadio puede ser el sistema principal de fijación de nitrógeno en algunas condiciones ambientales. La nitrogenasa de vanadio de *Azotobacter vinelandii* tiene la notable capacidad de catalizar la reducción del monóxido de carbono (CO) a etileno (C_2H_4), etano y propano.

La fijación del nitrógeno se lleva a cabo por una forma altamente reducida de la dinitrogenasa y precisa ocho electrones: seis para la reducción del N_2 y dos para formar una molécula de H_2. La producción de H_2 es parte obligada del mecanismo de reacción, pero se desconoce su papel biológico en el proceso.

La dinitrogenasa se reduce por transferencia de electrones procedentes de la dinitrogenasa reductasa **(Fig. 22-4)**. El tetrámero de la dinitrogenasa tiene dos sitios de unión para la reductasa. Los ocho electrones necesarios se transfieren desde la reductasa a la dinitrogenasa de uno en uno: una molécula de reductasa reducida se une a la dinitrogenasa y le transfiere un único electrón y a continuación la forma oxidada de la reductasa se disocia de la dinitrogenasa en un ciclo repetitivo. Cada vuelta del ciclo precisa la hidrólisis de dos moléculas de ATP por la reductasa dimérica. La fuente inmediata de electrones para reducir la dinitrogenasa reductasa es variable, pudiéndose utilizar **ferredoxina** reducida (véase la Sección 19.8), flavodoxina reducida y quizás otras fuentes. En al menos una especie, la fuente última de electrones para reducir la ferredoxina es el piruvato (Fig. 22-4).

El papel del ATP en este proceso es poco común. Recuérdese que el ATP puede proporcionar no sólo energía química, a través de la hidrólisis de uno o más de sus enlaces fosfoanhídrido, sino también energía de enlace mediante interacciones no covalentes que disminuyen la energía de activación. En la reacción llevada a cabo por la dinitrogenasa reductasa tanto la unión del ATP como la hidrólisis del ATP provocan cambios de conformación de la proteína que ayudan a superar la elevada energía de activación de la fijación del nitrógeno. La unión de dos moléculas de ATP a la reductasa desplaza el potencial de reducción (E'°) de esta proteína de -300 a -420 mV, un incremento de su potencial reductor que es necesario para transferir electrones al N_2 a través de la dinitrogenasa; el potencial de reducción estándar de la smi-reacción $N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3$ es -0,34 V. Las moléculas de ATP se hidrolizan a continuación, justo antes de la transferencia efectiva de un electrón a la dinitrogenasa.

La unión y la hidrólisis del ATP cambian la conformación de la nitrogenasa reductasa en dos regiones, que son estructuralmente homólogas de las regiones interruptor 1 e interruptor 2 de las proteínas de unión de GTP, implicadas en la señalización biológica (véase el recuadro 12-2). La unión del ATP produce un cambio conformacional que aproxima el centro 4Fe-4S de la reductasa al agregado P de la dinitrogenasa (alejado entre 18 Å y 14 Å), que facilita la transferencia de electrones entre la reductasa y la dinitrogenasa. No se cono-

COPY STATION

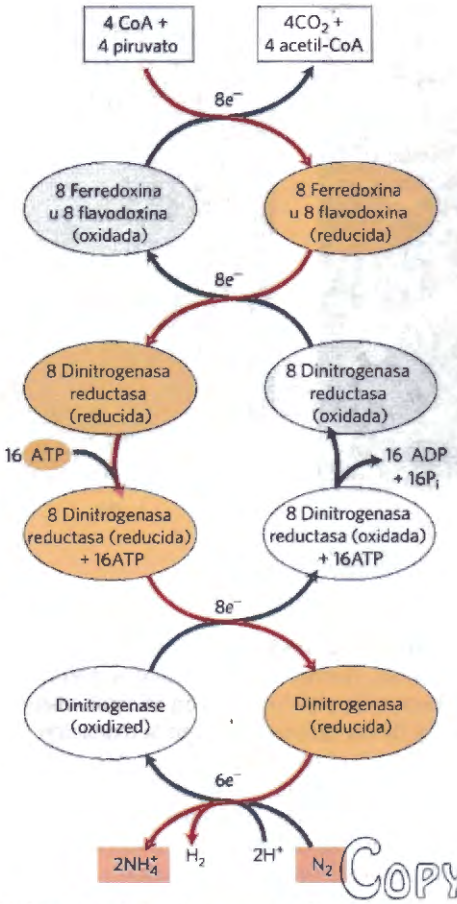


FIGURA 22-4 Ruta de los electrones en la fijación del nitrógeno por el complejo de la nitrogenasa. Los electrones se transfieren del piruvato a la dinitrogenasa a través de la ferredoxina (o flavodoxina) y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa reduce a la dinitrogenasa con un electrón cada vez. Se requieren al menos seis electrones para fijar una molécula de N_2. Se usan dos electrones adicionales para reducir $2H^+$ a H_2, en un proceso que acompaña obligatoriamente a la fijación del nitrógeno en los anaerobios. Ello hace un total de ocho electrones por molécula de N_2. La estructura de las subunidades y los cofactores metálicos de las proteínas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa se describen en el texto y en la Figura 22-3.

cen con seguridad los detalles de la transferencia de electrones desde el agregado P al cofactor FeMo, ni la manera cómo la nitrogenasa acumula ocho electrones ni cuales son los intermediarios de la reacción. Se están investigando dos hipótesis razonables, ambas con el átomo de Mo en el papel central **(Fig. 22-5)**.

El complejo de la nitrogenasa es extremadamente inestable en presencia de oxígeno. La reductasa se inactiva en contacto con el aire, con una vida media de 30 segundos; la dinitrogenasa tiene una vida media de solo 10 minutos en contacto con el aire. Las bacterias libres que fijan nitrógeno solucionan este problema de diferentes maneras. Algunas viven solamente en condiciones anaeróbicas o reprimen la síntesis de la nitrogenasa en presencia de oxígeno. Algunas bacterias aeróbicas, tales como *Azotobacter vinelandii*, desacoplan parcialmente el transporte electrónico de la síntesis de ATP, de manera que el oxígeno se quema tan pronto entra en la célula (véase el Recuadro 19-1). De hecho, cuando fijan nitrógeno los cultivos de estas bacterias se

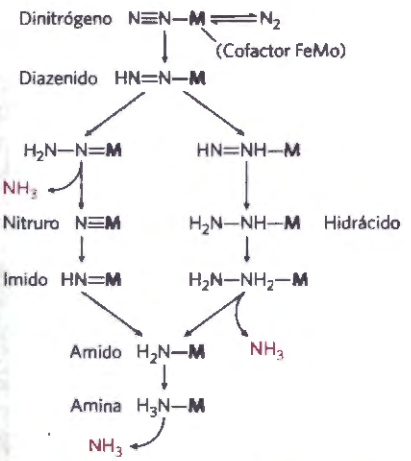


FIGURA 22-5 Dos hipótesis razonables de los intermediarios implicados en la reducción del N_2. El cofactor FeMo (abreviado como M) juega un papel central en ambos escenarios, uniéndose directamente a uno de los átomos de nitrógeno del N_2 y permaneciendo unido a lo largo de la secuencia de reacciones de reducción. [Fuente: información de L. C. Seefeldt et al., *Annu. Rev. Biochem.* 78:701, 2009, Fig. 9.]

calientan como resultado de sus esfuerzos para eliminar el oxígeno.

La relación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos de sus raíces **(Fig. 22-6)** resuelve a la vez las necesidades energéticas y la labilidad del complejo de la nitrogenasa frente al oxígeno. La energía necesaria para la fijación del nitrógeno fue probablemente la fuerza impulsora que a lo largo de la evolución condujo a esta asociación de plantas y bacterias. Las bacterias en los nódulos de las raíces tienen acceso a una gran reserva de energía en forma de abundantes glúcidos e intermediarios del ciclo del ácido cítrico suministrados por la planta. Ello permite a las bacterias fijar centenares de veces más nitrógeno que sus parientes próximos que viven libres en el suelo. Para solventar el problema de la toxicidad del oxígeno, las bacterias de los nódulos de las raíces están inmersas en una disolución de una hemoproteína fijadora de oxígeno, denominada **leghemoglobina**, producida por la planta (aunque el grupo hemo puede que sea proporcionado por la bacteria). La leghemoglobina fija todo el oxígeno a su alcance, de manera que éste no puede interferir con la fijación del nitrógeno y, a la vez, suministra eficazmente el oxígeno al sistema de transporte de electrones de la bacteria. El beneficio para la planta, por supuesto, es un suministro rápido de nitrógeno reducido. De hecho, los simbiontes bacterianos producen generalmente más NH_3 del necesario para su compañero simbiótico; el exceso se libera al suelo. La eficiencia de la simbiosis entre los vegetales y las bacterias resulta evidente por el enriquecimiento en nitrógeno del suelo propiciado por las plantas leguminosas. Este enriquecimiento del suelo en NH_3 es la base de los métodos de rotación de cosechas en los que el cultivo de plantas no leguminosas (tales como el maíz), que aprovechan el nitrógeno fijado presente en el suelo, se alterna cada pocos años con cultivos de leguminosas como la alfalfa, los guisantes o el trébol.

La fijación del nitrógeno es energéticamente costosa: 16 ATP y 8 pares de electrones para obtener sólo 2

COPY-STATION

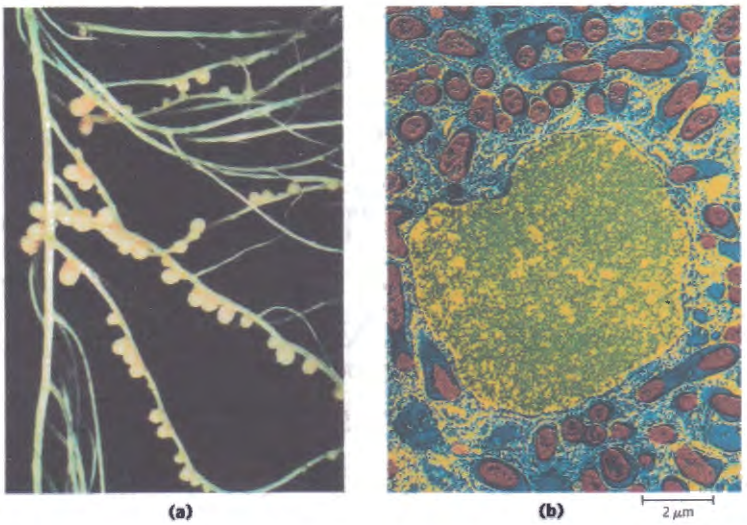


FIGURA 22-6 Nódulos fijadores de nitrógeno. (a) Nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces del guisante común, *Pisum saliva*, una leguminosa. La flor de esta planta se muestra en el recuadro. **(b)** Micrografía electrónica coloreada artificialmente de un corte delgado de un nódulo de la raíz del guisante. Bacterias simbiontes fijadoras de nitrógeno, o bacteroides (en rojo), viven en el interior de las células de los nódulos, envueltas por la membrana peribacteroide (en azul). Los bacteroides producen el complejo de la nitrogenasa, que convierte el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+); sin los bacteroides la planta es incapaz de utilizar N_2. Las células infectadas de la raíz proporcionan algunos factores esenciales para la fijación del nitrógeno, entre ellos la leghemoglobina; esta hemoproteína tiene una afinidad muy elevada por el oxígeno, que es un potente inhibidor de la nitrogenasa. (El núcleo de la célula se muestra en verde/amarillo. En esta micrografía no son visibles otros orgánulos de las células de la raíz infectadas, que se hallan normalmente en las células vegetales.) [Fuente: (a,b) Jeremy Burges/Fuente de Science.]

NH_3. No es sorprendente, por tanto, que el proceso esté estrictamente regulado para que el NH_3 se produzca sólo cuando sea necesario. La [ADP] elevada, un indicador de una baja [ATP], es un fuerte inhibidor de la nitrogenasa. El NH_4^+ reprime la expresión de los ~20 genes de fijación del nitrógeno (*nif*), bloqueando eficazmente la ruta. Algunos diazótrofos uutilizan la modificación covalente de la nitrogenasa para controlar la fijación del nitrógeno en respuesta a la disponibilidad de NH_4^+ en el medio. La trasferencia de un grupo ADP-ribosilo del NADH a un residuo Arg específico de la nitrogenasa reductasa bloquea la fijación de N_2 en *Rhodospirillum*, por ejemplo. Esta es la misma modificación covalente que vimos para la inhibición de las proteínas G por las toxinas del cólera y pertussis (véase el Recuadro 12-2).

La fijación del nitrógeno es objeto de intensos estudios debido a su enorme importancia práctica. La producción industrial de amoníaco para su utilización en fertilizantes necesita mucha energía, lo que ha estimulado los esfuerzos para desarrollar organismos recombinantes o transgénicos capaces de fijar el nitrógeno. En principio, las técnicas del DNA recombinante (Capítulo 9) podrían utilizarse para transferir el DNA que codifica los enzimas de la fijación del nitrógeno a bacterias no fijadoras de nitrógeno y a plantas. Sin embargo, estos genes por sí solos no son suficientes. Alrededor de 20 genes son esenciales para actividad de la nitrogenasa en las bacterias, muchos de ellos implicados en la síntesis, el ensamblaje y la inserción de los cofactores. También hay el problema de proteger el enzima en su nueva localización del efecto destructor del oxígeno. Los problemas del diseño de nuevas plantas fijadoras de nitrógeno son formidables. El éxito de estos esfuerzos dependerá de la solución del problema de la toxicidad del oxígeno en cualquier célula que produzca nitrogenasa.

El amoníaco se incorpora a las biomoléculas a través del glutamato y la glutamina

El nitrógeno reducido en forma NH_4^+ se incorpora primero a los aminoácidos y posteriormente a otras biomoléculas que contienen nitrógeno. Dos aminoácidos, **glutamato** y **glutamina**, constituyen el punto crítico de entrada. Recuerde que estos dos mismos aminoácidos tienen un papel central en el catabolismo del amoníaco y de los grupos amino en la oxidación de los aminoácidos (Capítulo 18). El glutamato es la fuente de grupos amino de la mayor parte de los aminoácidos restantes, a través de reacciones de transaminación (la reacción inversa de la que se muestra en la Fig. 18-4). El nitrógeno amídico de la glutamina es una fuente de grupos amino para una amplia gama de procesos biosintéticos. En la mayoría de tipos celulares, y de fluidos extracelulares en los organismos superiores, uno de estos aminoácidos o los dos están presentes en concentraciones más elevadas, a veces un orden de magnitud o más, que los otros aminoácidos. Una célula de *Escherichia coli* necesita tanto glutamato que este aminoácido resulta ser uno de los principales solutos del citosol. Su concentración está regulada, no sólo en respuesta a las necesidades de nitrógeno por parte de la célula, sino también para mantener el equilibrio osmótico entre el citosol y el medio externo.

Las vías biosintéticas que conducen al glutamato y a la glutamina son sencillas y todos o algunos de sus pasos se encuentran en la mayoría de organismos. La vía más importante para la incorporación del NH_4^+ en el glutamato requiere dos reacciones. Primero, la **glutamina sintetasa** cataliza la reacción del glutamato y el NH_4^+ para dar glutamina. Esta reacción tiene lugar en dos pasos, con el γ-glutamil fosfato unido al enzima como intermediario (véase la Fig. 18-8):

(1) Glutamato + ATP ⟶ γ-glutamil fosfato + ADP

(2) γ-Glutamil fosfato + NH_4^+ ⟶ glutamina + P_i + H^+

Suma: Glutamato + NH_4^+ + ATP ⟶ glutamina + ADP + P_i + H^+ (22-1)

La glutamina sintetasa se encuentra en todos los organismos. Además de su importancia para la asimilación del NH_4^+ en las bacterias, esta reacción tiene un papel

central en el metabolismo de los aminoácidos en los mamíferos, al convertir el NH_4^+ libre, que es tóxico, en glutamina para su transporte en la sangre (Capítulo 18).

En las bacterias y en las plantas, el glutamato se produce a partir de la glutamina en una reacción catalizada por la **glutamato sintasa**. (Un nombre alternativo para este enzima es glutamato:oxoglutarato aminotransferasa, cuyo acrónimo GOGAT, también se usa para designar el enzima). El α-cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, experimenta una aminación reductora, utilizando glutamina como dador de nitrógeno:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{glutamina} + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ \text{glutamato} + NADP^+ \quad (22\text{-}2)$$

La reacción global de la glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa (Ecs. 22-1 y 22-2) es:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + NADPH + ATP \longrightarrow \text{L-glutamato} + NADP^+ + ADP + P_i$$

Los animales carecen de glutamato sintasa; no obstante, el glutamato se mantiene a niveles elevados por procesos tales como la transaminación del α-cetoglutarato durante el catabolismo de los aminoácidos.

El glutamato también se puede formar, aunque en menor medida, por otra vía: la reacción del α-cetoglutarato y el NH_4^+ para formar glutamato en un solo paso. Está catalizada por la L-glutamato deshidrogenasa, un enzima presente en todos los organismos. El poder reductor lo proporciona el NADPH:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + NADPH \longrightarrow \text{L-glutamato} + NADP^+ + H_2O$$

Copyrighted Material

Encontramos esta reacción en el catabolismo de los aminoácidos (véase la Fig. 18-7). En las células eucarióticas, la L-glutamato deshidrogenasa se localiza en la matriz mitocondrial. El equilibrio de la reacción favorece a los reactivos, y la K_m para el NH_4^+ (~1 mM) es tan alta que probablemente la contribución de la reacción a la asimilación del NH_4^+ en los aminoácidos y otros metabolitos es muy pequeña. (Recuerde que la reacción de la glutamato deshidrogenasa, en sentido contrario (véase la Fig. 18-10), es una fuente de NH_4^+ para el ciclo de la urea.) Unas concentraciones de NH_4^+ suficientemente elevadas para que la reacción de la glutamato deshidrogenasa contribuya de manera significativa a los niveles de glutamato se obtienen solamente cuando se añade NH_3 al suelo o cuando los microorganismos crecen en el laboratorio en presencia de concentraciones elevadas de NH_3. En general, las bacterias del suelo y las plantas utilizan la vía de los dos enzimas, descrita anteriormente (Ecs. 22-1, 22-2).

La glutamina sintetasa es un punto de regulación primario del metabolismo del nitrógeno

La actividad de la glutamina sintetasa está regulada en prácticamente todos los organismos, lo que no es sorprendente si consideramos su papel metabólico central como punto de entrada del nitrógeno reducido. En las bacterias entéricas tales como *Escherichia coli* la regulación es sumamente compleja. El enzima de tipo I (de las bacterias) está formado por 12 subunidades idénticas de M_r 50.000 **(Fig. 22-7)** y está regulado alostérica-

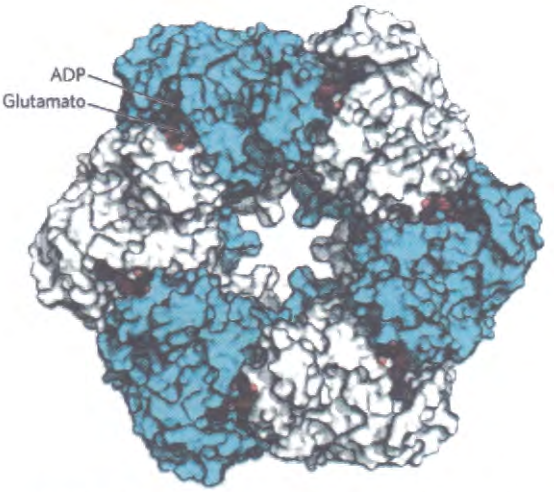


FIGURA 22-7 Estructura en subunidades de la glutamina sintetasa bacteriana tipo I. Esta vista muestra 6 de las 12 subunidades idénticas; una segunda capa de 6 subunidades se encuentra por debajo de las seis mostradas. Cada una de las 12 subunidades tiene un sitio activo, donde se unen el ATP y el glutamato en orientaciones que favorecen la transferencia de un grupo fosforilo del ATP al carboxilo de la cadena lateral del glutamato. En esta estructura cristalina el ADP ocupa el sitio del ATP. Fuente: PDB ID 2GLS, M.M.Yamashita et al., *J. Biol. Chem.* 264: 17,681,1989.]

mente y por modificación covalente. (El enzima del tipo II de los eucariotas y algunas bacterias tiene 10 subunidades idénticas). Alanina, glicina y al menos seis productos finales del metabolismo de la glutamina son inhibidores alostéricos del enzima **(Fig. 22-8)**. Cada inhibidor por sí solo causa solamente una inhibición parcial. Los efectos de los distintos inhibidores son más

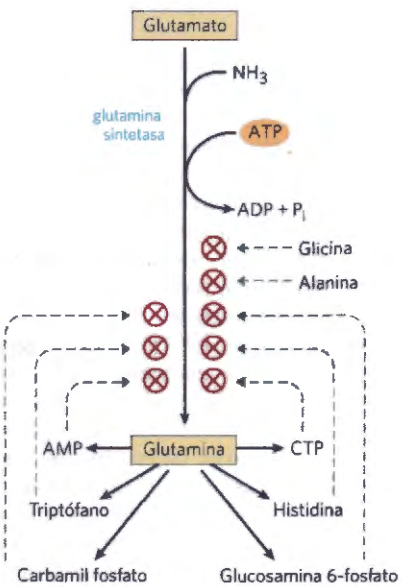


FIGURA 22-8 Regulación alostérica de la glutamina sintetasa. El enzima está regulado de forma acumulativa por seis productos finales del metabolismo de la glutamina. La alanina y la glicina actúan probablemente de indicadores del estado general del metabolismo de los aminoácidos en la célula.

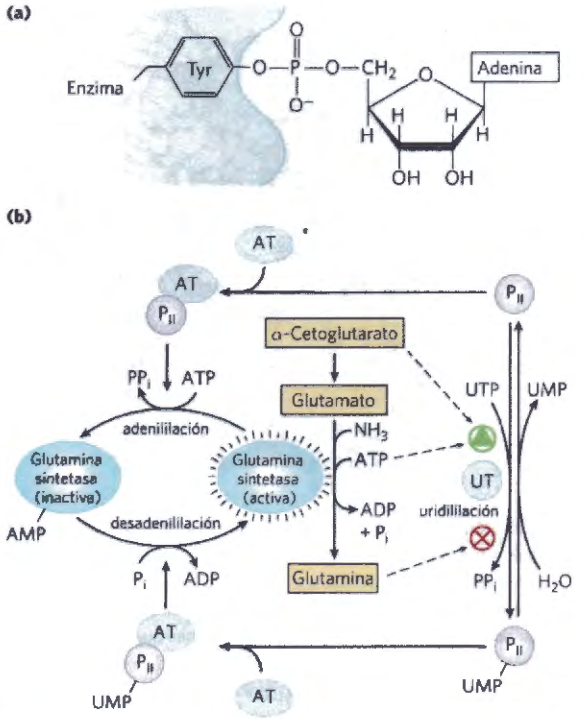


FIGURA 22-9 Segundo nivel de regulación de la glutamina sintetasa: modificaciones covalentes. (a) Un residuo Tyr adenililado. **(b)** Cascada que conduce a la adenililación (inactivación) de la glutamina sintetasa. AT representa la adenililtransferasa; UT, la uridililtransferasa. P_{II} es una proteína reguladora, regulada a su vez por uridililación. Los detalles de esta cascada se comentan en el texto.

que aditivos, de manera quelos ocho actuando conjuntamente llegan a inactivar totalmente el enzima. Esto es un ejemplo de retroinhibición acumulativa. Este mecanismo de control proporciona un ajuste continuo de los niveles de glutamina en respuesta a los requerimientos metabólicos inmediatos.

A la regulación alostérica se superpone la inhibición por adenililación (incorporación de AMP) de la Tyr^{397}, localizada cerca del centro activo del enzima **(Fig. 22-9)**. Esta modificación covalente incrementa la sensibilidad del enzima a los inhibidores alostéricos, y la actividad disminuye cuantas más subunidades son adenililadas. Tanto la adenililación como la desadenililación son promovidas por la **adenililtransferasa** (AT en la Fig. 22-9), que forma parte de una compleja cascada enzimática que responde a los niveles de glutamina, α-cetoglutarato, ATP y P_i. La actividad de la adenilil transferasa está modulada por la unión a una proteína reguladora denominada P_{II}, y la actividad de P_{II} es a su vez regulada por modificación covalente (uridililación) de nuevo en un residuo de Tyr. El complejo adenililtransferasa con P_{II} uridililada (P_{II}-UMP) estimula la desadenililación, mientras que el mismo complejo con P_{II} desuridililada estimula la adenililización de la glutamina sintetasa. Tanto la uridililación como la desuridililación de P_{II} se llevan a cabo por un único enzima, la **uridililtransferasa**. La uridililación es inhibida por unión de glutamina y P_i a la uridililtransferasa y es estimulada por la unión de α-cetoglutarato y ATP a P_{II}.

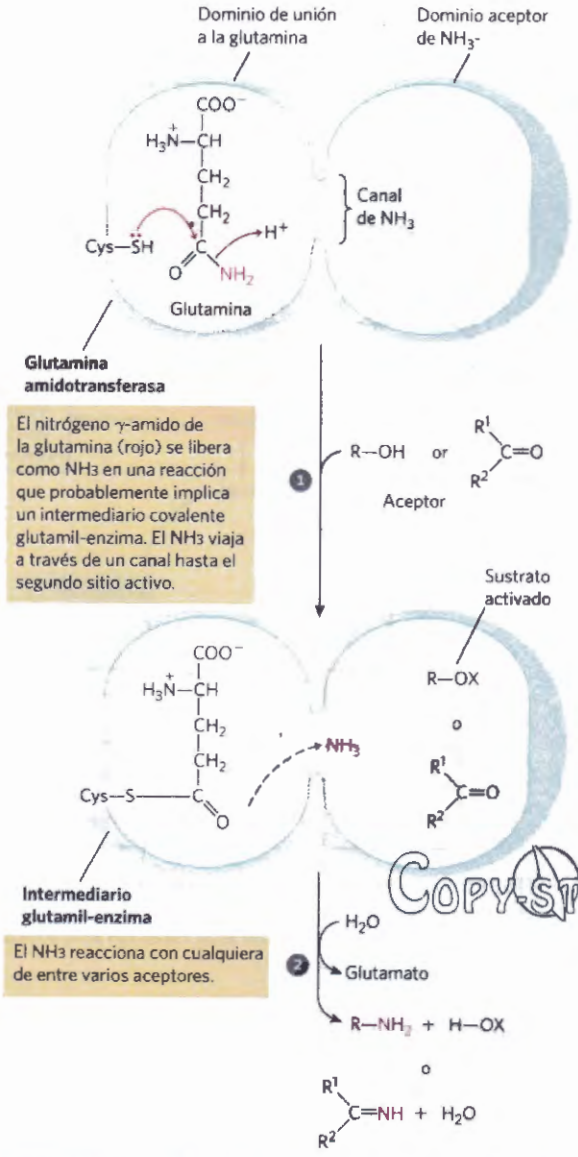
La regulación no se detiene aquí. P_{II} uridililada también facilita la activación de la transcripción del gen que codifica la glutamina sintetasa, con el aumento consiguiente de la concentración celular del enzima; P_{II} desuridililada provoca un descenso en la transcripción del mismo gen. En este mecanismo interviene la interacción de P_{II} con otras proteínas implicadas en la regulación génica, de un tipo descrito en el Capítulo 28. El resultado neto de este complejo sistema de controles es una disminución de la actividad glutamina sintetasa cuando los niveles de glutamina son altos y un incremento de la actividad cuando los niveles de glutamina son bajos y el α-cetoglutarato y el ATP (sustratos de la reacción de la sintetasa) están disponibles. Los múltiples niveles de regulación permiten una respuesta sensible en la que la síntesis de glutamina se ajusta a las necesidades celulares.

Varios tipos de reacciones tienen papeles específicos en la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos

Las vías que se describen en este capítulo contienen una amplia variedad de reordenamientos químicos interesantes. Algunos de ellos se repiten y merecen un comentario especial antes de describir las propias rutas metabólicas. Estos son, (1) las reacciones de transaminación y otros reordenamientos propiciados por enzimas que utilizan piridoxal fosfato; (2) la transferencia de grupos de un carbono, utilizando tetrahidrofolato (normalmente en los niveles de oxidación de —CHO y $—CH_2OH$) o *S*-adenosilmetionina (al nivel de oxidación de $—CH_3$) como cofactores, y (3) la transferencia de grupos amino procedentes del nitrógeno amídico de la glutamina. El piridoxal fosfato (PLP), el tetrahidrofolato (H_4 folato) y la *S*-adenosilmetionina (adoMet) han sido descritos en detalle en el Capítulo 18 (véanse las Figs. 18-6, 18-17 y 18-18). Aquí nos centraremos en la transferencia de grupos amino a partir del grupo amida de la glutamina.

Hay más de una docena de reacciones biosintéticas conocidas en las que la glutamina es la principal fuente fisiológica de grupos amino. La mayor parte de estas reacciones se encuentran en las rutas metabólicas tratadas en este capítulo. La clase de enzimas que catalizan estas reacciones se denominan **glutamina amidotransferasas.** Todas ellas tienen dos dominios estructurales: uno que fija la glutamina y otro que fija el segundo sustrato, que actúa de aceptor del grupo amino **(Fig. 22-10)**. Posiblemente, un residuo Cys conservado en el dominio de unión de la glutamina actúa como nucleófilo, rompiendo el enlace amida de la glutamina y formando un intermedio glutamilo unido covalentemente al enzima. El NH_3 que se produce en esta reacción no se libera sino que se transfiere a través de un "canal de amoníaco" a un segundo sitio activo donde reacciona con el segundo sustrato para formar el producto aminado. El intermedio covalente se hidroliza para dar enzima libre y glutamato. Si se ha de activar el segundo sustrato, generalmente se utiliza ATP para formar un intermedio acil fosfato (R-OX en la Fig. 22-10, donde X es un grupo fosforilo). La glutaminasa actúa de forma similar, pero usa H_2O como segundo sustrato, de manera que produce NH_4^+ y glutamato (véase la Fig. 18-8).

COPY-STATION



MECANISMO FIGURA 22-10 Mecanismo propuesto para las glutamina amidotransferasas. Cada enzima tiene dos dominios. El dominio de unión a la glutamina tiene una serie de elementos estructurales que se han conservado en muchos de estos enzimas, entre los que se encuentra un residuo Cys necesario para la actividad. El dominio del aceptor de NH_3 (segundo sustrato) es variable. Se muestran dos tipos de aceptores de grupos amino. X representa un grupo activador, normalmente un grupo fosforilo derivado del ATP, que facilita el desplazamiento de un grupo hidroxilo del R-OH por NH_3.

RESUMEN 22.1 Visión general del metabolismo del nitrógeno

■ El nitrógeno molecular que constituye hasta el 80% de la atmósfera terrestre no es asequible a la mayoría de organismos hasta que se encuentra en forma reducida. La fijación del N_2 atmosférico tiene lugar en ciertas bacterias que viven autónomamente y en bacterias simbióticas en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas.

■ En las bacterias del suelo y de las plantas vasculares, la acción secuencial de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa convierte el NO_3^- en NH_3, que puede ser asimilado en forma de compuestos de nitrógeno.

■ El ciclo del nitrógeno conduce a la formación de amoníaco por fijación bacteriana del N_2, nitrificación del amoníaco a nitrato por organismos del suelo, conversión del nitrato en amoníaco por las plantas superiores, síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco por todos los organismos y conversión del nitrato en N_2 por las bacterias desnitrificantes del suelo. Las bacterias anamox oxidan anaeróbicamente el amoníaco a nitrógeno, utilizando el nitrito como aceptor de electrones.

■ El complejo de la nitrogenasa lleva a cabo la fijación del N_2 en forma de NH_3, en una reacción que requiere ATP y poder reductor. El complejo de la nitrogenasa es muy lábil en presencia de O_2 y está sujeto a regulación en función de la disponibilidad de NH_3.

■ En los sistemas vivos, el nitrógeno reducido se incorpora primeramente a los aminoácidos y seguidamente a muchas otras biomoléculas, incluidas los nucleótidos. El punto de entrada clave es el aminoácido glutamato. El glutamato y la glutamina son los dadores de nitrógeno en una gran variedad de reacciones biosintéticas. La glutamina sintetasa, que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato, es un importante enzima regulador del metabolismo del nitrógeno.

■ Las rutas biosintéticas de los aminoácidos y nucleótidos utilizan repetidamente los cofactores biológicos piridoxal fosfato, tetrahidrofolato y *S*-adenosilmetionina. El piridoxal fosfato es necesario para las reacciones de transaminación en las que interviene el glutamato y para otras transformaciones de los aminoácidos. Las transferencias de un carbono requieren *S*-adenosilmetionina y tetrahidrofolato. Las glutamina amidotransferasas catalizan reacciones que incorporan nitrógeno procedente de la glutamina.

COPYSTATION

22.2 Biosíntesis de los aminoácidos

Todos los aminoácidos proceden de intermediarios de la glucólisis, del ciclo del ácido cítrico o de la vía de las pentosas fosfato **(Fig. 22-11)**. El nitrógeno entra en estas vías a través del glutamato y la glutamina. Algunas rutas son sencillas, otras complejas. La síntesis de diez de los aminoácidos precisa tan sólo de uno o de pocos pasos desde el metabolito común del que proceden. Las vías biosintéticas de otros aminoácidos, tales como los aminoácidos aromáticos, son más complejas.

Los distintos organismos presentan considerables diferencias en su capacidad para sintetizar los 20 aminoácidos estándar. Mientras que la mayor parte de bacterias y plantas pueden sintetizar los 20 aminoácidos, los mamíferos sólo pueden sintetizar la mitad, generalmente aquéllos cuyas vías metabólicas son sencillas. Estos son los denominados **aminoácidos no esenciales**, que no son necesarios en la dieta (véase la Tabla 18-1). El resto, los **aminoácidos esenciales**, deben obtenerse de los alimentos. A menos que se indique lo contrario, las vías para los 20 aminoácidos estándar que se presentan a continuación pertenecen a las bacterias.

Un procedimiento que resulta útil para ordenar estas vías biosintéticas consiste en agruparlos en seis familias, según sus precursores metabólicos (Tabla 22-1). Hemos aplicado este criterio para organizar las descripciones detalladas que se presentan a continua-

TABLA 22-1 Familias biosintéticas de los aminoácidos agrupadas según sus precursores metabólicos

α-Cetoglutarato	**Piruvato**
Glutamato	Alanina
Glutamina	Valina*
Prolina	Leucina*
Arginina	Isoleucina*
3-Fosfoglicerato	**Fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato**
Serina	Triptófano*
Glicina	Fenilalanina*
Cisteína	Tirosina†
Oxalacetato	**Ribosa 5-fosfato**
Aspartato	Histidina*
Asparagina	
Metionina*	
Treonina*	
Lisina*	

*Aminoácidos esenciales en los mamíferos.
†Derivado de la fenilalanina en los mamíferos.

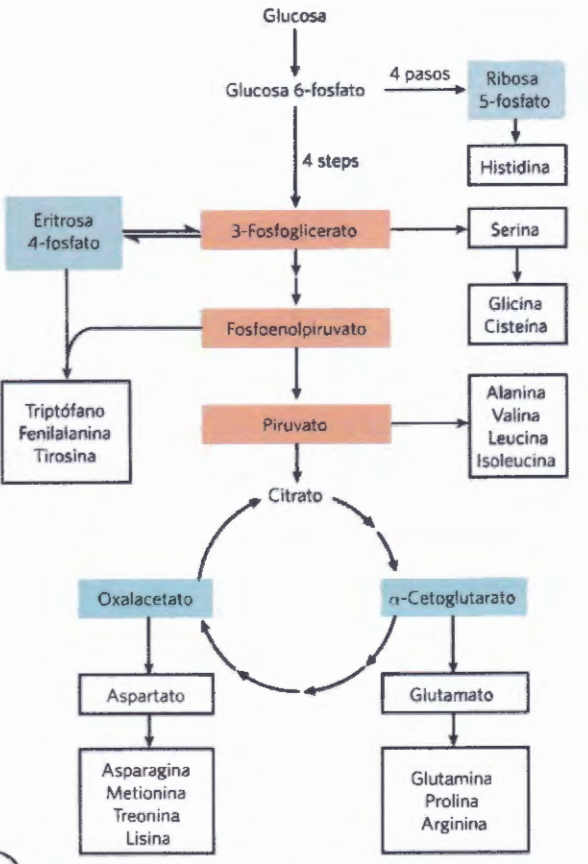
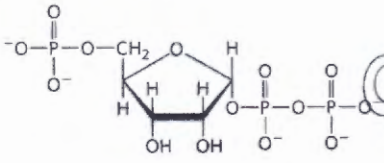


FIGURA 22-1 Esquema general de la biosíntesis de los aminoácidos. Los esqueletos carbonados de los precursores proceden de tres fuentes: glucólisis (en rosa), ciclo del ácido cítrico (en azul) y vía de las pentosas fosfato (en violeta).

ción. Además de estos seis precursores hay un compuesto intermediario notable que aparece en varias vías de síntesis de aminoácidos y nucleótidos: el **5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP):**

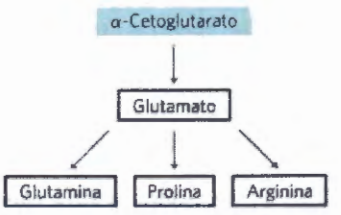


El PRPP se sintetiza a partir de la ribosa-5-fosfato, procedente de la vía de las pentosas fosfato (véase la Fig. 14-22), en una reacción catalizada por la **ribosa fosfato pirofosfoquinasa:**

Ribosa 5-fosfato + ATP ⟶ 5-fosforribosil-1-pirofosfato + AMP

Este enzima está regulado alostéricamente por muchas de las biomoléculas que se forman a partir del PRPP.

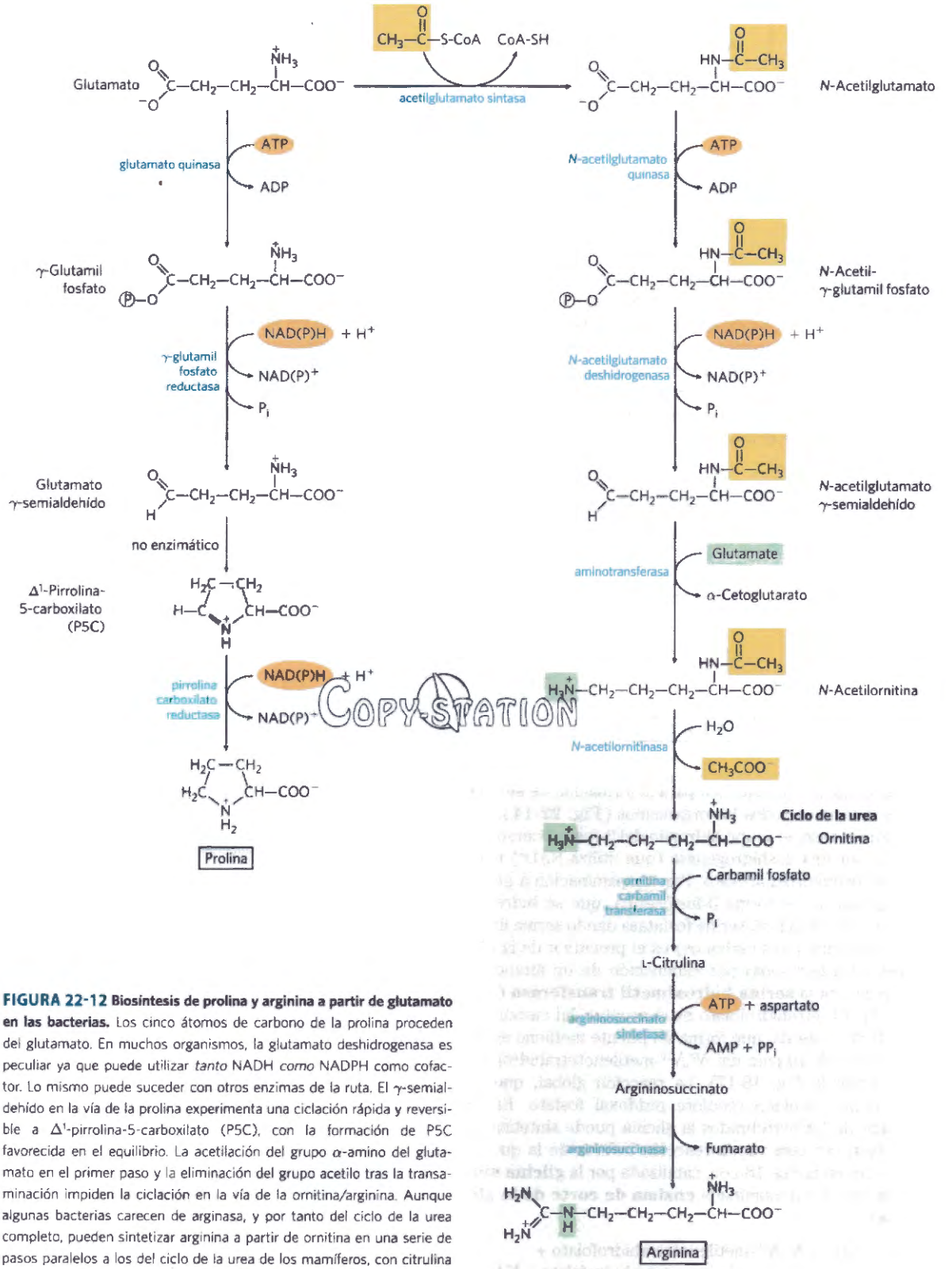
El α-cetoglutarato es precursor del glutamato, la glutamina, la prolina y la arginina



Ya hemos descrito la biosíntesis del **glutamato** y la **glutamina**. La **prolina** es un derivado cíclico del glutamato **(Figura 22-12)**. En el primer paso de la síntesis de la prolina, el ATP reacciona con el grupo γ-carboxilo del glutamato para formar un acil fosfato, que es reducido por el NADPH o el NADH a glutamato γ-semialdehído. Este intermediario se cicla rápida y espontáneamente y a continuación se vuelve a reducir para dar prolina.

La **arginina** se sintetiza a partir del glutamato a través de la ornitina y el ciclo de la urea en los animales (Capítulo 18). En principio, la ornitina también podría sintetizarse a partir del glutamato γ-semialdehído por transaminación, pero la ciclación espontánea del semialdehído en la vía de la prolina impide un suministro suficiente de este intermediario para la síntesis de ornitina. Las bacterias poseen una vía para la biosíntesis de novo de la ornitina (y, por tanto, de la arginina) que incorpora algunos pasos de la vía de la prolina, pero que incluye dos pasos adicionales que evitan el problema de la ciclación espontánea del glutamato γ-semialdehído (Fig. 22-12). En el primer paso, el grupo α-amino del glutamato se bloquea al inicio de la vía por una reacción de acetilación, que requiere acetil-CoA; a continuación, después de la transaminación, el se elimina grupo acetilo para dar ornitina.

Las vías de la prolina y de la arginina presentan algunas diferencias en los mamíferos. La prolina se puede sintetizar por la vía mostrada en la Figura 22-12, pero también se forma a partir de la arginina obtenida de la dieta o de la proteína tisular. La arginasa, un enzima del ciclo de la urea, convierte la arginina en ornitina y urea (véanse las Figs. 18-10, 18-26). La ornitina se convierte en glutamato γ-semialdehído por el enzima **ornitina δ-aminotransferasa (Fig. 22-13)**. El semialdehído se



COPY-STATION

FIGURA 22-12 Biosíntesis de prolina y arginina a partir de glutamato en las bacterias. Los cinco átomos de carbono de la prolina proceden del glutamato. En muchos organismos, la glutamato deshidrogenasa es peculiar ya que puede utilizar *tanto* NADH *como* NADPH como cofactor. Lo mismo puede suceder con otros enzimas de la ruta. El γ-semialdehído en la vía de la prolina experimenta una ciclación rápida y reversible a Δ^1-pirrolina-5-carboxilato (P5C), con la formación de P5C favorecida en el equilibrio. La acetilación del grupo α-amino del glutamato en el primer paso y la eliminación del grupo acetilo tras la transaminación impiden la ciclación en la vía de la ornitina/arginina. Aunque algunas bacterias carecen de arginasa, y por tanto del ciclo de la urea completo, pueden sintetizar arginina a partir de ornitina en una serie de pasos paralelos a los del ciclo de la urea de los mamíferos, con citrulina y argininosuccinato como intermediarios (véase la Fig. 18-10).

Aquí, y en figuras posteriores de este capítulo, las flechas de reacción indican la ruta lineal hacia los productos finales, sin considerar la reversibilidad de los diferentes pasos individuales. Por ejemplo, el paso de la ruta que lleva a la arginina, catalizado por la *N*-acetilglutamato deshidrogenasa, es químicamente similar a la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de la glucólisis (véase la Fig. 14-8), siendo fácilmente reversible.

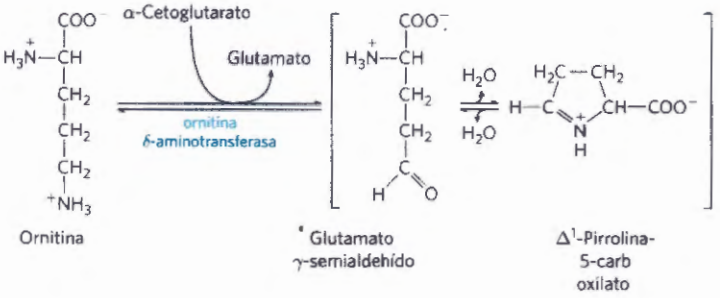


FIGURA 22-13 Reacción de la ornitina δ-aminotransferasa: un paso de la vía de la prolina en los mamíferos. Este enzima se encuentra en la matriz mitocondrial de la mayoría de tejidos. Aunque el equilibrio favorece la formación de P5C, en los mamíferos, la reacción inversa es la única vía para la síntesis de ornitina (y por tanto de arginina) cuando los niveles de arginina son insuficientes para la síntesis de proteínas.

cicla para formar Δ^1-pirrolina-5-carboxilato, que se convierte en prolina (Fig. 22-12). Los mamíferos no poseen la vía para la síntesis de arginina mostrada en la Figura 22-12. Cuando la arginina procedente de la dieta o del recambio proteico es insuficiente para la síntesis de proteínas, la reacción de la ornitina δ-aminotransferasa opera en la dirección de formación de ornitina. La ornitina se convierte entonces en citrulina y arginina en el ciclo de la urea.

La serina, la glicina y la cisteína proceden del 3-fosfoglicerato



COPY-STATION

La principal vía metabólica para la formación de **serina** es la misma en todos los organismos **(Fig. 22-14)**. En el primer paso, el grupo hidroxilo del 3-fosfoglicerato se oxida por una deshidrogenasa (que utiliza NAD^+) para dar 3-fosfohidroxipiruvato. Por transaminación a partir de glutamato se forma 3-fosfoserina, que se hidroliza por acción de la fosfoserina fosfatasa dando serina libre.

La serina (tres carbonos) es el precursor de la **glicina** (dos carbonos) por eliminación de un átomo de carbono por la **serina hidroximetil transferasa** (Fig. 22-14). El tetrahidrofolato es el aceptor del carbono β (C-3) de la serina, que forma un puente metileno entre el N-5 y el N-10 para dar N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (véase la Fig. 18-17). La reacción global, que es reversible, también requiere piridoxal fosfato. En el hígado de los vertebrados la glicina puede sintetizarse también por otra vía: la reacción inversa de la que se muestra en la Fig. 18-20c, catalizada por la **glicina sintasa** también denominada **enzima de corte de la glicina**):

$$CO_2 + NH_4^+ + N^5,N^{10}\text{-metilenotetrahidrofolato} + NADH + H^+ \longrightarrow \text{glicina} + \text{tetrahidrofolato} + NAD^+$$

Las plantas y las bacterias producen el azufre reducido necesario para la síntesis de **cisteína** (y de metionina, descrita más adelante) de los sulfatos del medio; la vía se muestra en el lado derecho de la **Figura 22-15**. El sulfato se activa en dos etapas formando 3-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), que se reduce a sulfuro con ocho electrones. El sulfuro se usa a continuación en la formación de cisteína a partir de la serina en una vía de dos pasos. En los mamíferos la cisteína se fabrica a partir de dos aminoácidos: la metionina proporciona el átomo de azufre y la serina el esqueleto carbonado. La metionina se convierte primero en *S*-adenosilmetionina (véase la Fig. 18-18), que puede ceder su grupo metilo a cualquiera de entre varios aceptores, para dar *S*-adenosilhomocisteína (adoHcy). Este producto desmetilado se hidroliza para dar homocisteína libre, que reacciona con la serina en una reacción catalizada por la **cista-**

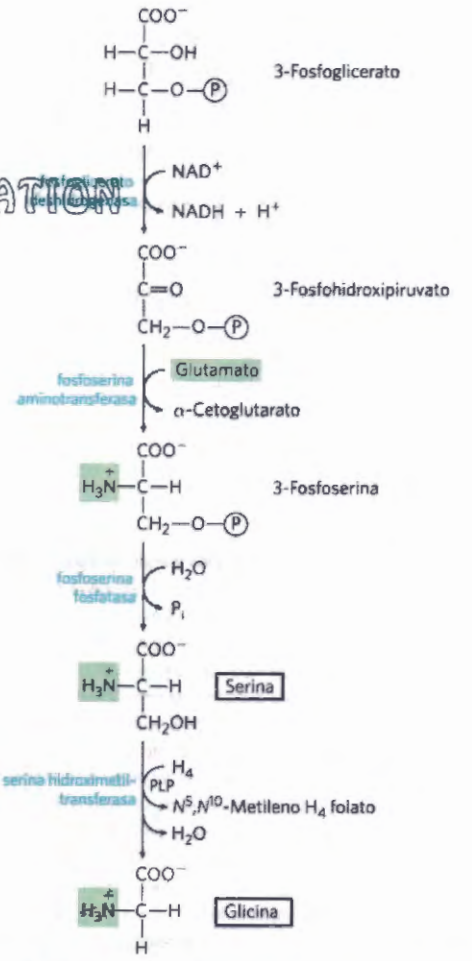


FIGURA 22-14 Biosíntesis de serina a partir de 3-fosfoglicerato y de glicina a partir de serina en todos los organismos. La glicina también puede formarse a partir de CO_2 y NH_4^+ por acción de la glicina sintasa, con N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato como dador del grupo metilo (véase el texto).

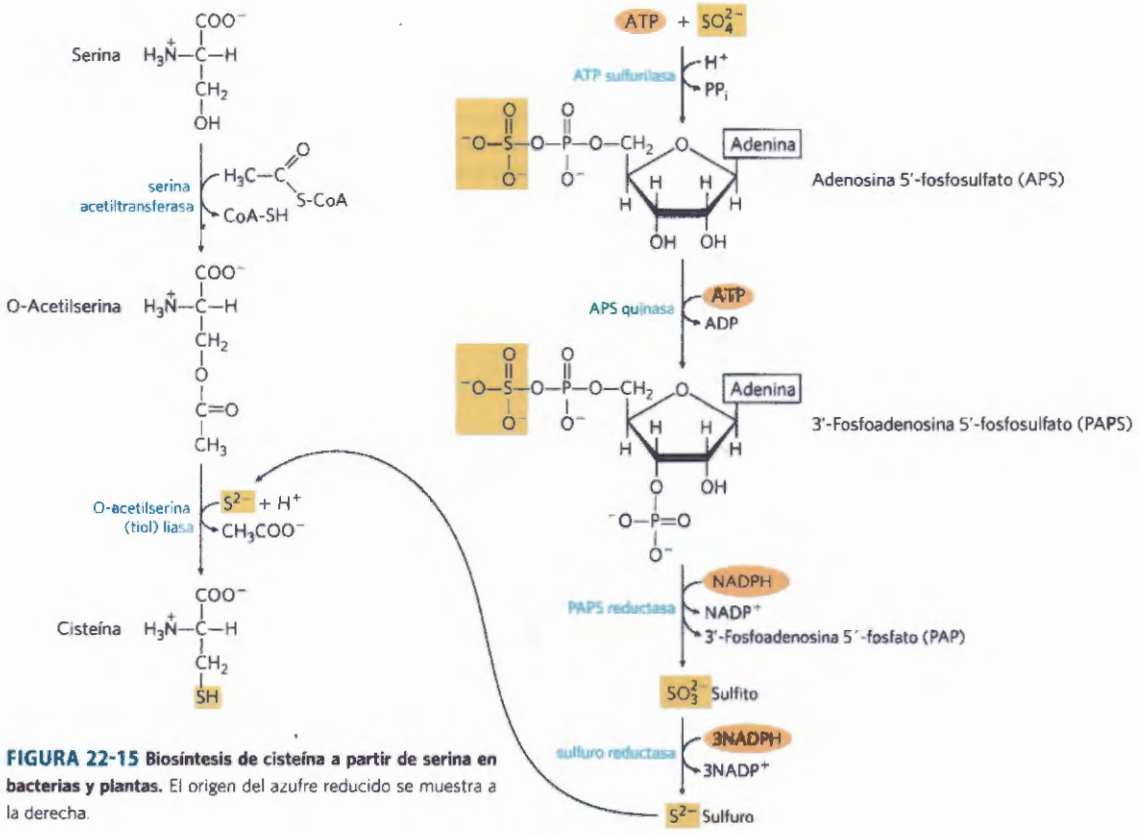


FIGURA 22-15 Biosíntesis de cisteína a partir de serina en bacterias y plantas. El origen del azufre reducido se muestra a la derecha.

COPY-STATION

tionina β-sintasa para dar cistationina (Fig. 22-16). Por último, la **cistationina γ-liasa**, un enzima que precisa PLP, cataliza la eliminación de amoníaco y la ruptura de la cistationina para dar cisteína libre.

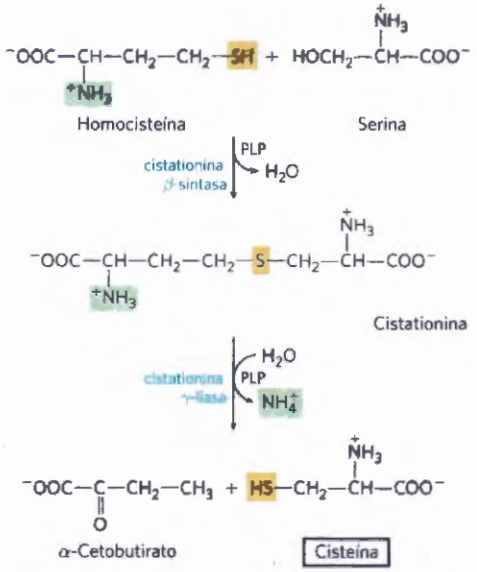
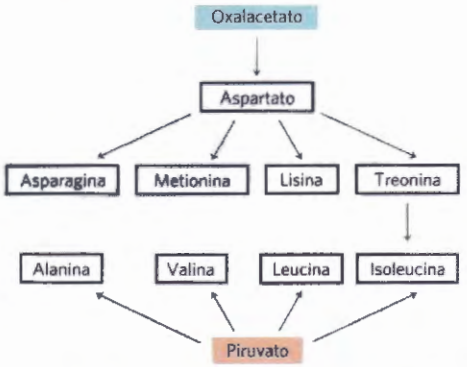


FIGURA 22-16 Biosíntesis de cisteína a partir de homocisteína y serina en mamíferos. La homocisteína se forma a partir de metionina tal como se describe en el texto.

Tres aminoácidos no esenciales y seis aminoácidos esenciales se sintetizan a partir de oxalacetato y piruvato



La **alanina** y el **aspartato** se sintetizan a partir de piruvato y de oxalacetato, respectivamente, por transaminación con el glutamato. La **asparagina** se sintetiza por amidación del aspartato, utilizando la glutamina como dador de NH_4^+. Estos aminoácidos no son esenciales y sus sencillos mecanismos de biosíntesis se hallan en todos los organismos.

Por razones sólo en parte conocidas, los linfocitos malignos presentes en la leucemia linfoblástica aguda infantil (ALL) requieren asparagina sérica para su crecimiento. La quimioterapia para la ALL se administra junto con una L-asparaginasa de origen bacteriano con objeto de reducir la asparagina sérica. El tratamiento combinado resulta en le remisión del 95 %

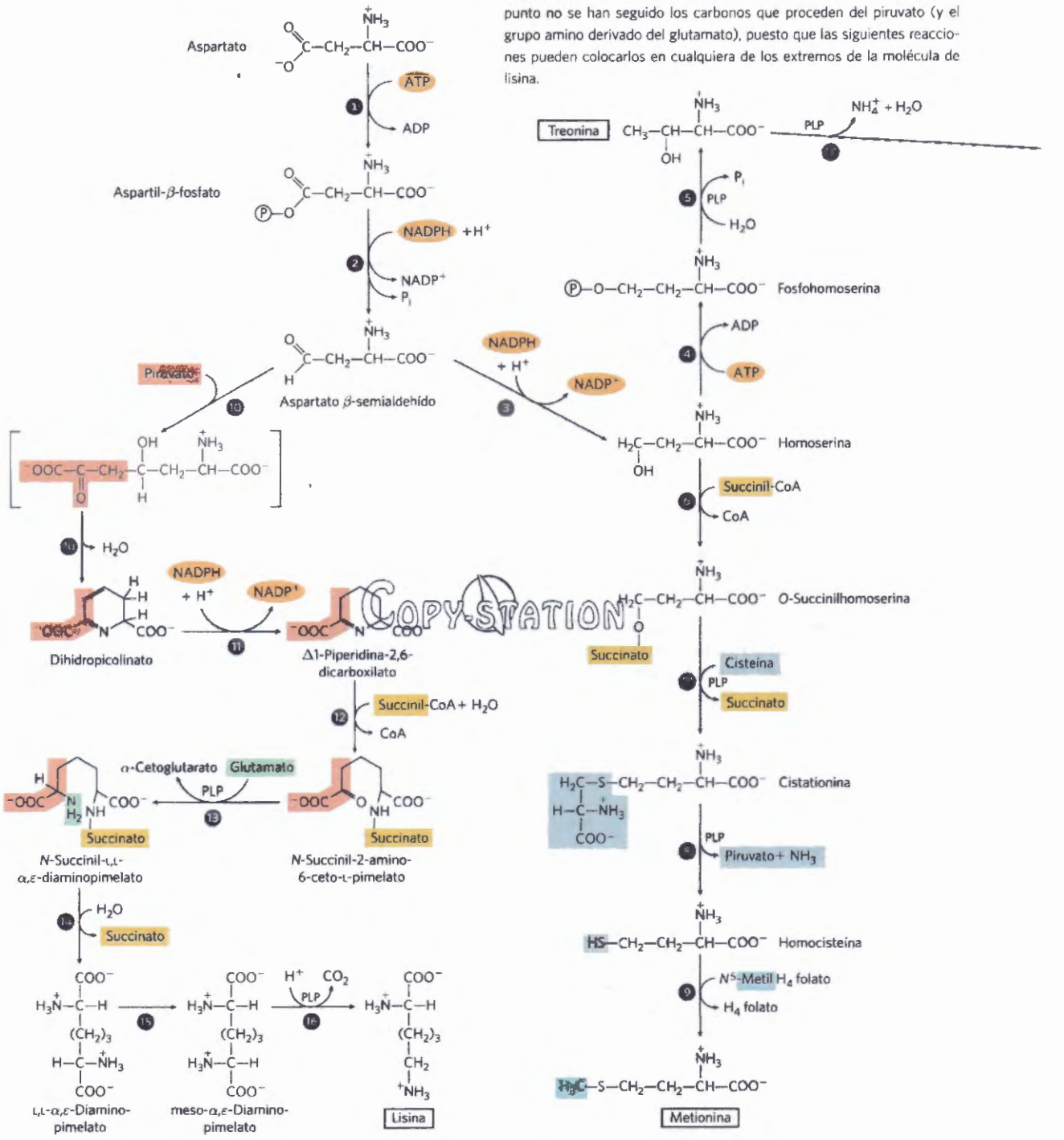
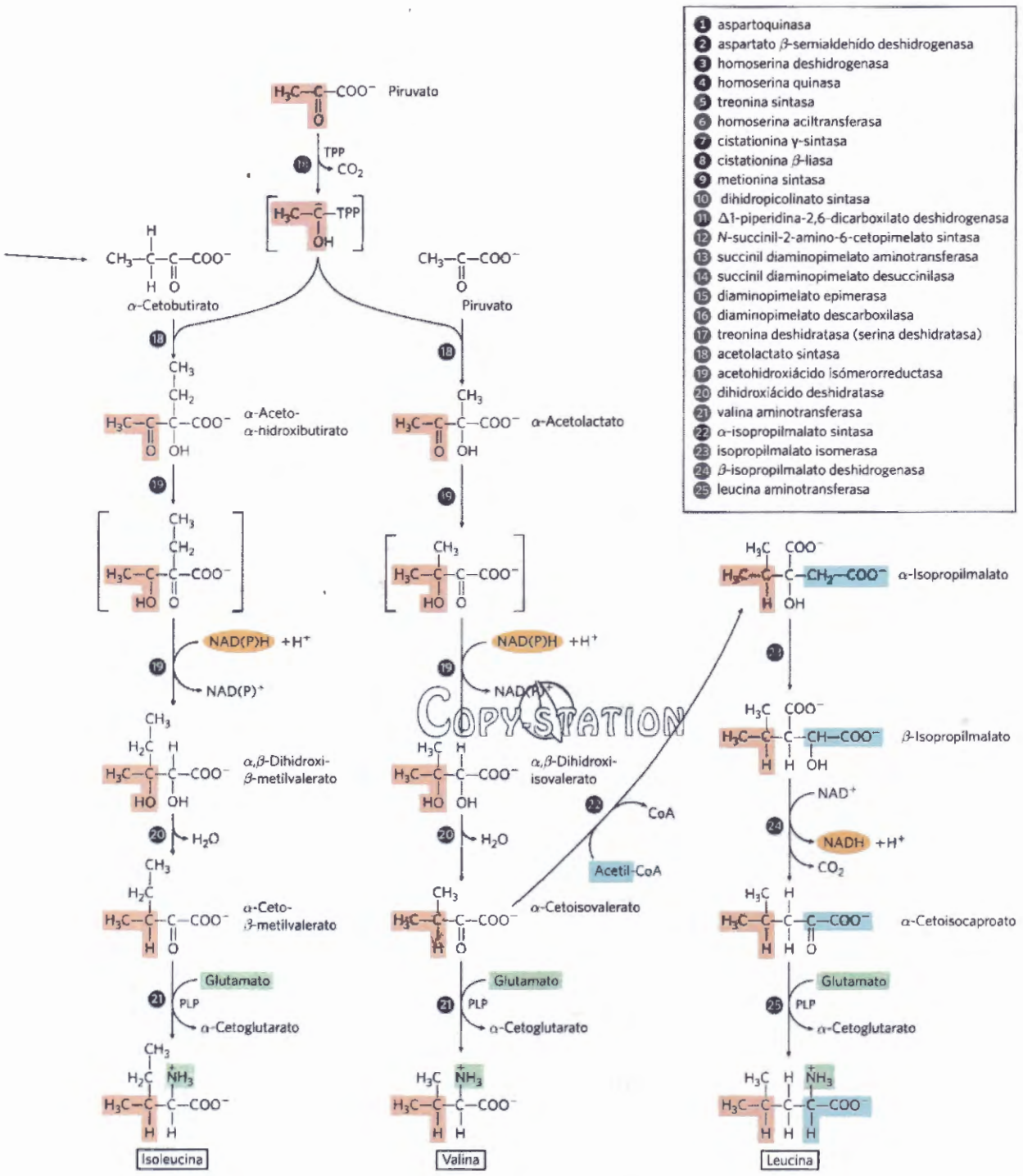


FIGURA 22-17 Biosíntesis de seis aminoácidos esenciales a partir de oxalacetato y piruvato en bacterias: metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina y leucina. Aquí, al igual que en otras rutas con múltiples pasos, los enzimas se indican en la clave. Observe que el L,L-α,ε-diaminopimelato, el producto del paso ⓮, es simétrico. Más allá de este punto no se han seguido los carbonos que proceden del piruvato (y el grupo amino derivado del glutamato), puesto que las siguientes reacciones pueden colocarlos en cualquiera de los extremos de la molécula de lisina.

de los casos de ALL infantil (el tratamiento solamente con L-asparaginasa resulta en la remisión de entre el 40 % y el 60 % de los casos). Sin embargo, el tratamiento con asparaginasa tiene efectos secundarios perjudiciales y alrededor del 10% de los pacientes recuperados sufren recaídas con tumores resistentes al tratamiento. Se están desarrollando inhibidores de la asparagina sintetasa humana para mejorar la terapia contra la ALL infantil. ■

La metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina y leucina son aminoácidos esenciales; los humanos no pueden sintetizarlos. Sus rutas biosintéticas son complejas y están interconectadas **(Fig. 22-17)**. En algunos casos, las vías de las bacterias, hongos y plantas



difieren significativamente. Las rutas de las bacterias se muestran en la Figura 22-17.

El aspartato da lugar a **metionina**, **treonina** y **lisina**. Los puntos de ramificación se encuentran en el aspartato β-semialdehído, un intermediario de las tres vías, y en la homoserina, un precursor de la treonina y la metionina. La treonina es a su vez uno de los precursores de la isoleucina. Las vías de la **valina** y la **isoleucina** comparten cuatro enzimas (Fig. 22-17, pasos 18 a 21). El piruvato da lugar a valina y a isoleucina a través de rutas que empiezan por la condensación de dos átomos de carbono del piruvato (en forma de hidroxietil tiamina pirofosfato; véase la Fig. 14-15) con otra molécula de piruvato (ruta de la valina) o con α-cetobutirato (ruta de la isoleucina). El α-cetobutirato se forma a partir de la treonina en una reacción que requiere piridoxal fosfato (Fig. 22-17, paso 17). Un intermediario de la vía de la valina, el α-cetoisovalerato, es el punto de

partida de una vía colateral que en cuatro pasos conduce a la **leucina** (pasos ㉑ a ㉕).

El corismato es un intermediario clave en la síntesis del triptófano, la fenilalanina y la tirosina



Los anillos aromáticos no son fácilmente asequibles en el medio, a pesar de que el anillo bencénico es muy estable. La ruta ramificada que conduce al triptófano, fenilalanina y tirosina en bacterias, hongos y plantas, es la vía biológica principal para la formación del anillo aromático. Consiste en el cierre en anillo de un precursor alifático seguido de la adición secuencial de dobles enlaces. Los primeros cuatro pasos conducen al shiquimato, cuyos siete carbonos proceden de la eritrosa 4-fosfato y del fosfoenolpiruvato **(Fig. 22-18)**. El shiquimato se convierte en corismato en tres pasos en los cuales se incorporan otros tantos átomos de carbono procedentes de otra molécula de fosfoenolpiruvato. El corismato es el primer punto de ramificación de la vía, con una rama que conduce al triptófano y otra a la fenilalanina y a la tirosina.

En la rama del **triptófano (Fig. 22-19)**, el corismato se convierte en antranilato. En esta reacción la

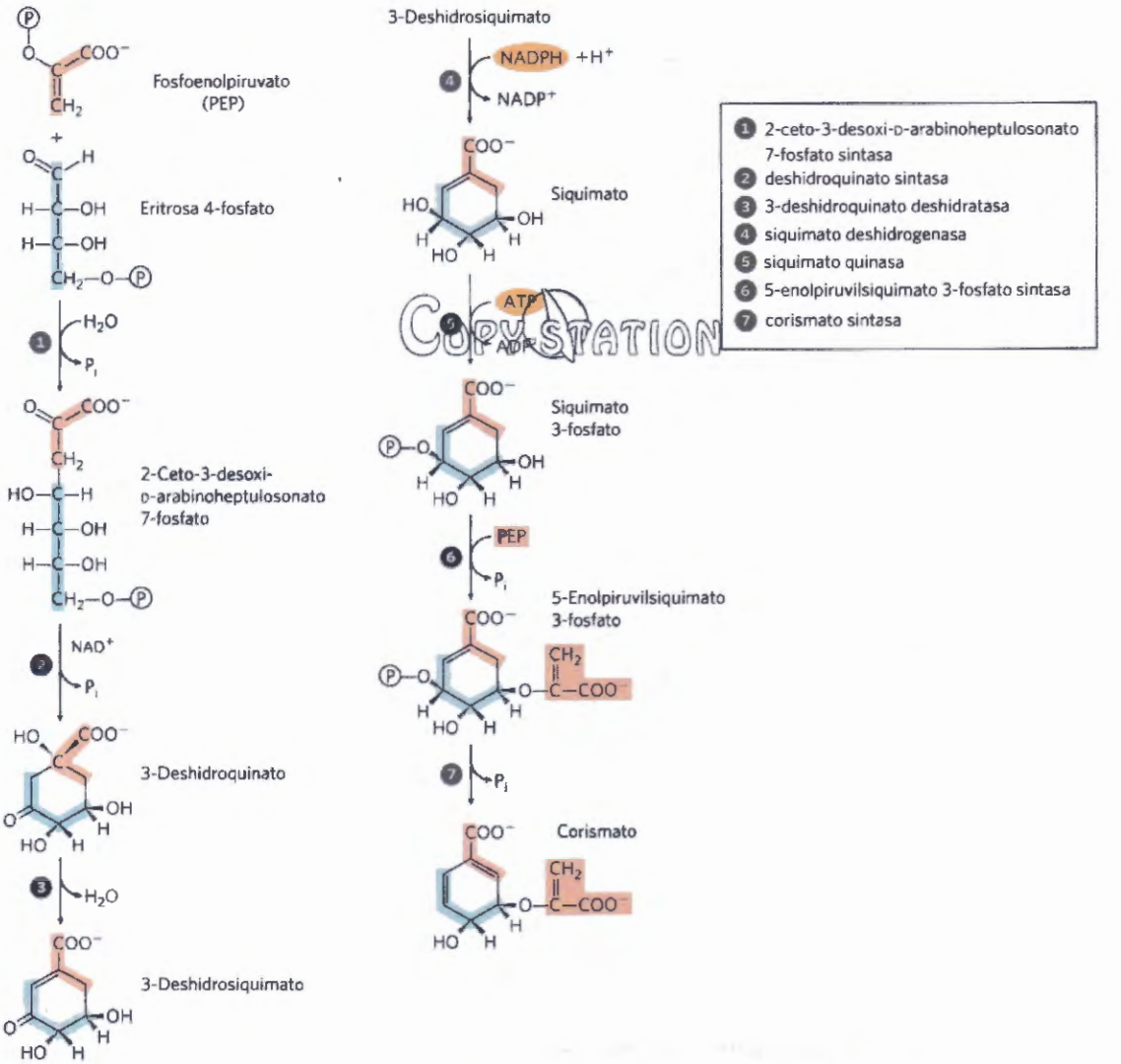


FIGURA 22-18 Biosíntesis del corismato, un intermediario de la síntesis de aminoácidos aromáticos en bacterias y plantas. Todos los carbonos provienen de la eritrosa 4-fosfato (violeta claro) o del fosfoenolpiruvato (rosa). Observe que el NAD^+ que se precisa como cofactor en el paso ❷ se desprende inalterado; puede que sea momentáneamente reducido a NADH durante la reacción, con formación de un intermediario de reacción oxidado. El paso ❻ es inhibido competitivamente por el glifosato ($^-OOC\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}PO_3^{2-}$), el ingrediente activo del herbicida ampliamente usado Roundup. El herbicida es relativamente inocuo para los mamíferos, que carecen de esta vía biosintética. Los nombres químicos quinato, shiquimato y corismato derivan de los nombres de las plantas donde se ha encontrado que se acumulan estos intermediarios.

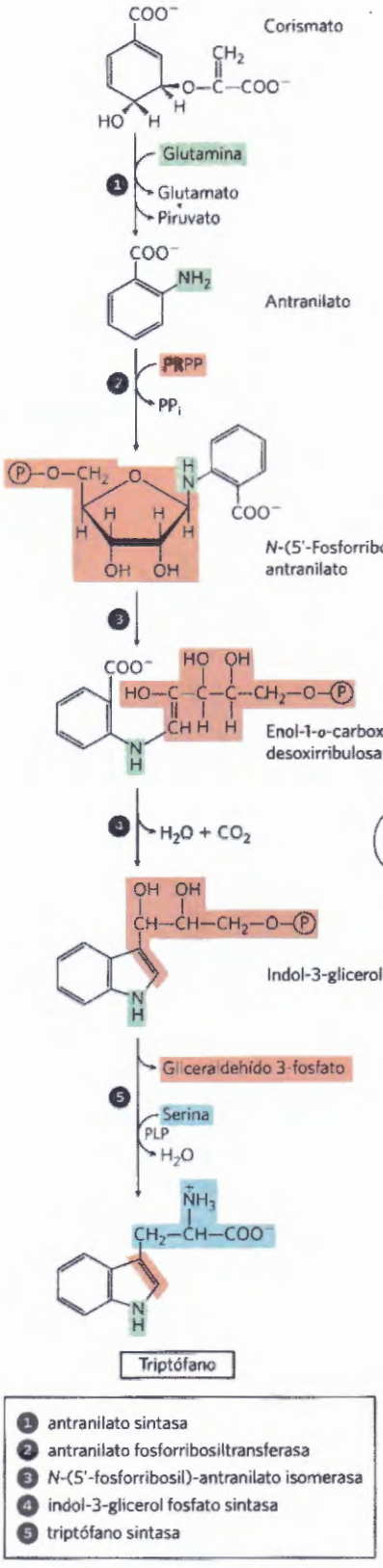


FIGURA 22-19 Biosíntesis del triptófano a partir del corismato en bacterias y plantas. En *E. coli* los enzimas que catalizan los pasos ❶ y ❷ son subunidades de un mismo complejo.

glutamina proporciona el nitrógeno que formará parte integrante del anillo de indol. El antranilato se condensa a continuación con PRPP. El anillo indólico del triptófano se forma a partir de los carbonos del anillo y del grupo amino del antranilato más dos carbonos procedentes del PRPP. La reacción final de la secuencia está catalizada por la **triptófano sintasa**. Este enzima tiene una estructura en subunidades $\alpha_2\beta_2$ y puede disociarse en dos subunidades α y una subunidad β_2 que catalizan diferentes partes de la reacción global:

$$\text{Indol-3-glicerol fosfato} \xrightarrow[\text{subunidad } \alpha]{} \text{indol + gliceraldehído 3-fosfato}$$

$$\text{Indol + serina} \xrightarrow[\text{subunidad } \beta_2]{} \text{triptófano + } H_2O$$

La segunda parte de la reacción requiere piridoxal fosfato **(Fig. 22-20)**. El indol formado en el primer paso no es liberado por el enzima, sino que se desplaza a través de un canal desde el sitio activo de la subunidad α hasta uno de los sitios activos de la subunidad β, donde se condensa con un producto intermedio, del tipo base de Schiff, derivado de la serina y del PLP. Esta forma de canalizar los compuestos intermedios puede ser una característica del conjunto de la vía del corismato al triptófano. Los sitios activos enzimáticos que catalizan los distintos pasos (a veces no secuenciales) de la vía hasta el triptófano se hallan en una misma cadena polipeptídica en algunos hongos y bacterias, pero en otras especies se encuentran en proteínas separadas. Además, la actividad de algunos de estos enzimas precisa una asociación no covalente con otros enzimas de la vía. Todas estas observaciones sugieren que todas las actividades enzimáticas de la ruta forman parte de un gran complejo multienzimático, tanto en las bacterias como en los eucariotas. Aunque estos complejos generalmente no se mantienen intactos cuando se aíslan los enzimas utilizando procedimientos bioquímicos tradicionales, cada vez hay más pruebas experimentales de la existencia de complejos multienzimáticos para ésta y otras vías metabólicas (véase la Sección 16.3).

COPY-STATION

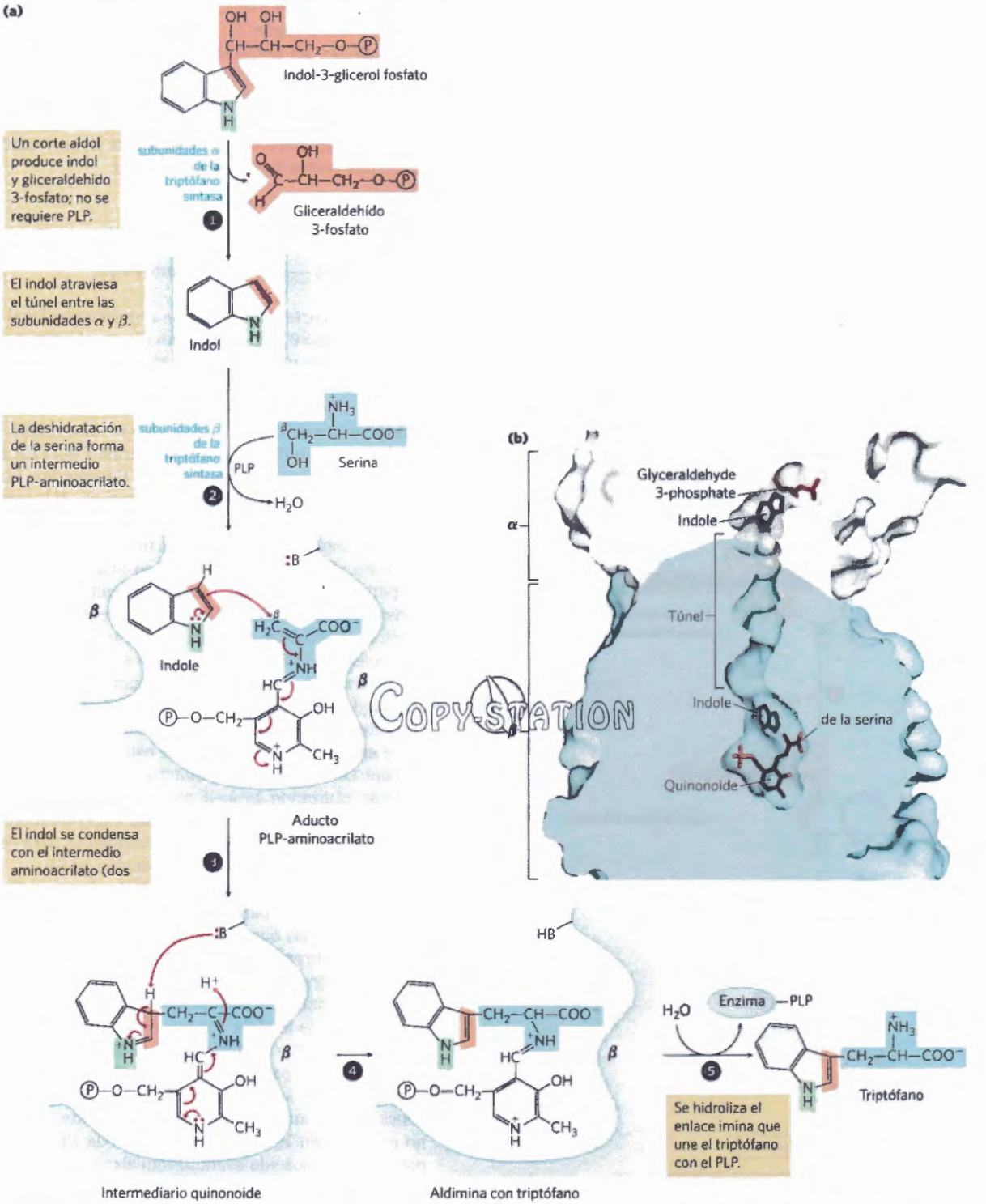
En plantas y bacterias, la **fenilalanina** y la **tirosina** se sintetizan a partir de corismato a través de vías menos complejas que la del triptófano. El intermediario común es el prefenato **(Fig. 22-21)**. El último paso en ambos casos es la transaminación con glutamato.

Los animales pueden producir tirosina directamente a partir de la fenilalanina por hidroxilación del grupo fenilo en C-4 por la **fenilalanina hidroxilasa;** este enzima también participa en la degradación de la fenilalanina (véanse las Figs. 18-23, 18-24). La tirosina se considera un aminoácido condicionalmente esencial o no esencial, en la medida en que puede sintetizarse a partir del aminoácido esencial fenilalanina.

La biosíntesis de la histidina utiliza precursores de la biosíntesis de purinas



La vía de la **histidina** en todas las plantas y bacterias difiere en varios aspectos de las vías biosintéticas de



MECANISMO FIGURA 22-20 Reacción de la triptófano sintasa. (a) Este enzima cataliza una reacción de múltiples pasos con diferentes tipos de reordenaciones químicas. Estas transformaciones facilitadas por el PLP tienen lugar en el carbono β (C-3) del aminoácido, contrariamente a las reacciones en el carbono α descritas en la Fig. 18-6. El carbono β de la serina se incorpora al anillo indol. **(b)** (PDB ID 1KFJ) El indol generado en la subunidad α (blanco) se desplaza a través de un túnel hacia la subunidad β (azul), en donde se condensa con la serina. [Fuente: **(b)** PDB ID IKF, V. Kulik et al. *J. Mol.Biol.* 324:677, 2000.]

otros aminoácidos. La histidina proviene de tres precursores **(Fig. 22-22)**: el PRPP aporta cinco carbonos, el anillo purínico del ATP aporta un nitrógeno y un carbono mientras que el segundo nitrógeno del anillo proviene de la glutamina. Los pasos clave son la condensación del ATP y del PRPP, en la que el N-1 del anillo de la purina se une al C-1 activado de la ribosa del PRPP (paso ❶ en la Fig. 22-22); la apertura del anillo de puri-

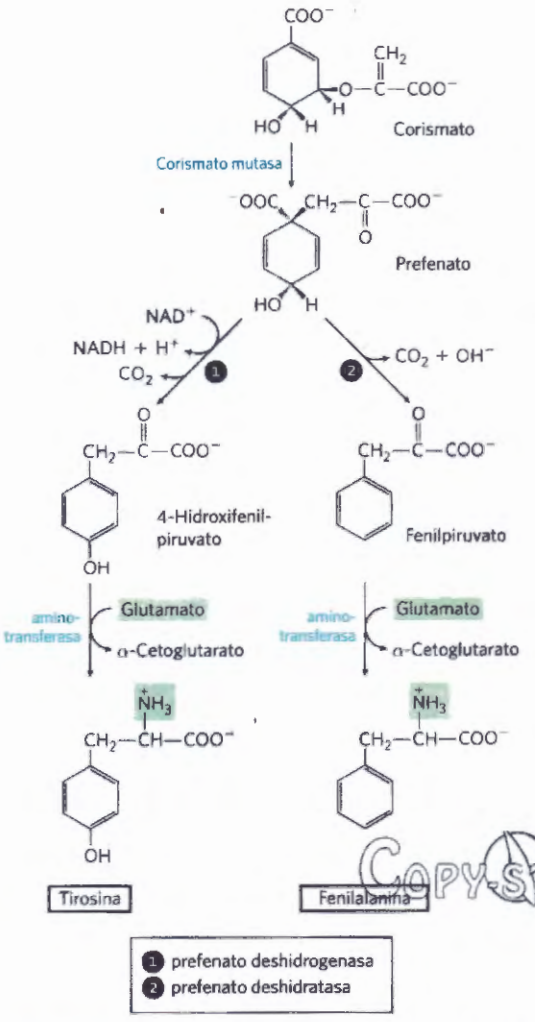


FIGURA 22-21 Biosíntesis de la fenilalanina y la tirosina a partir del corismato en bacterias y plantas. La conversión del corismato en prefenato es un ejemplo biológico raro de una reordenación de Claisen.

na que al final deja el N-1 y el C-2 de la adenina unidos a la ribosa (paso ❸) y la formación del anillo de imidazol en una reacción en la que la glutamina aporta un nitrógeno (paso ❺). La utilización del ATP como metabolito en lugar de como cofactor de alta energía es poco habitual, pero no es un derroche de energía, puesto que este proceso está conectado con la ruta biosintética de las purinas. El remanente de la molécula de ATP que se libera tras la transferencia del N-1 y del C-2 es el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR), un intermediario de la biosíntesis de las purinas (véase la Fig. 22-35), que se recicla rápidamente a ATP.

La biosíntesis de los aminoácidos se encuentra bajo control alostérico

Tal como se ha examinado en el Capítulo 15, el control del flujo a través de una vía metabólica es a menudo el reflejo de la actividad de los múltiples enzimas de la vía. En el caso de la síntesis de aminoácidos, la regulación tiene lugar en parte por retroinhibición de la primera reacción por el producto final de la vía. La primera reacción normalmente está catalizada por un enzima alostérico que juega un papel importante en el control global del flujo a través de la vía. Como ejemplo, la **Figura 22-23** muestra la regulación alostérica de la síntesis de isoleucina a partir de treonina (que se detalla en la Fig. 22-17). El producto final, la isoleucina, es un inhibidor alostérico de la primera reacción de la secuencia. En las bacterias, la modulación alostérica controla constantemente la síntesis de aminoácidos para adaptarla a las necesidades de la célula.

La regulación alostérica de un determinado enzima puede ser mucho más compleja. Un ejemplo es la amplia variedad de controles alostéricos a los que está sometida la actividad de la glutamina sintetasa de *E. coli* (Fig. 22-8). Seis productos derivados de la glutamina actúan como moduladores de retroalimentación negativa del enzima, siendo los efectos globales de éstos y otros moduladores más que aditivos. Este tipo de regulación se denomina **inhibición concertada.**

Otros mecanismos también contribuyen a la regulación de las rutas biosintéticas de los aminoácidos. Puesto que los 20 aminoácidos estándar deben producirse en las proporciones correctas para la síntesis de proteínas, las células han desarrollado sistemas para controlar no sólo la velocidad de síntesis de los aminoácidos individuales sino también para coordinar su producción. Este tipo de coordinación está especialmente bien desarrollado en las células bacterianas en crecimiento rápido. La **Figura 22-24** muestra cómo las células de *E. coli* coordinan la síntesis de lisina, metionina, treonina e isoleucina, todos ellos sintetizados a partir de aspartato. Resultan evidentes varios patrones importantes de inhibición. El paso de aspartato a aspartil-β-fosfato está catalizado por tres isozimas, cada uno controlado independientemente por distintos moduladores. Esta **multiplicidad enzimática** impide que un producto biosintético final obstaculice pasos clave de una vía metabólica cuando se precisan otros productos de la misma vía. Los pasos de aspartato β-semialdehído a homoserina y de treonina a α-cetobutirato (detallados en la Fig. 22-17) también están catalizados por dos isozimas, controlados independientemente. Uno de los isozimas para la conversión del aspartato a aspartil-β-fosfato es inhibido alostéricamente por dos moduladores distintos, la lisina y la isoleucina, cuya actuación conjunta es más que aditiva, lo que constituye otro ejemplo de inhibición concertada. La secuencia del aspartato a la isoleucina tiene múltiples etapas de retroinhibición negativa solapadas; por ejemplo, la isoleucina inhibe la conversión de la treonina en α-cetobutirato (como se ha descrito anteriormente), y la treonina inhibe su propia formación en tres puntos: a partir de la homoserina, del aspartato β-semialdehído y de aspartato (pasos ❹ ❸ y ❶ en la Fig. 22-17). Este mecanismo global de regulación se conoce como **retroinhibición secuencial.**

Se encuentran patrones similares en las rutas que conducen a los aminoácidos aromáticos. El primer paso de la ruta que conduce inicialmente al intermediario común corismato está catalizado por el enzima 2-ceto-3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa (paso ❶ de la Fig. 22-18). La mayoría de microorganismos y plantas tienen tres isozimas de la DAHP sintasa. Uno de ellos es inhibido alostéricamente (retroinhibición) por fenilalanina, otro por tirosina y el tercero por triptófano. Este esquema ayuda a que la ruta

COPY-STATION

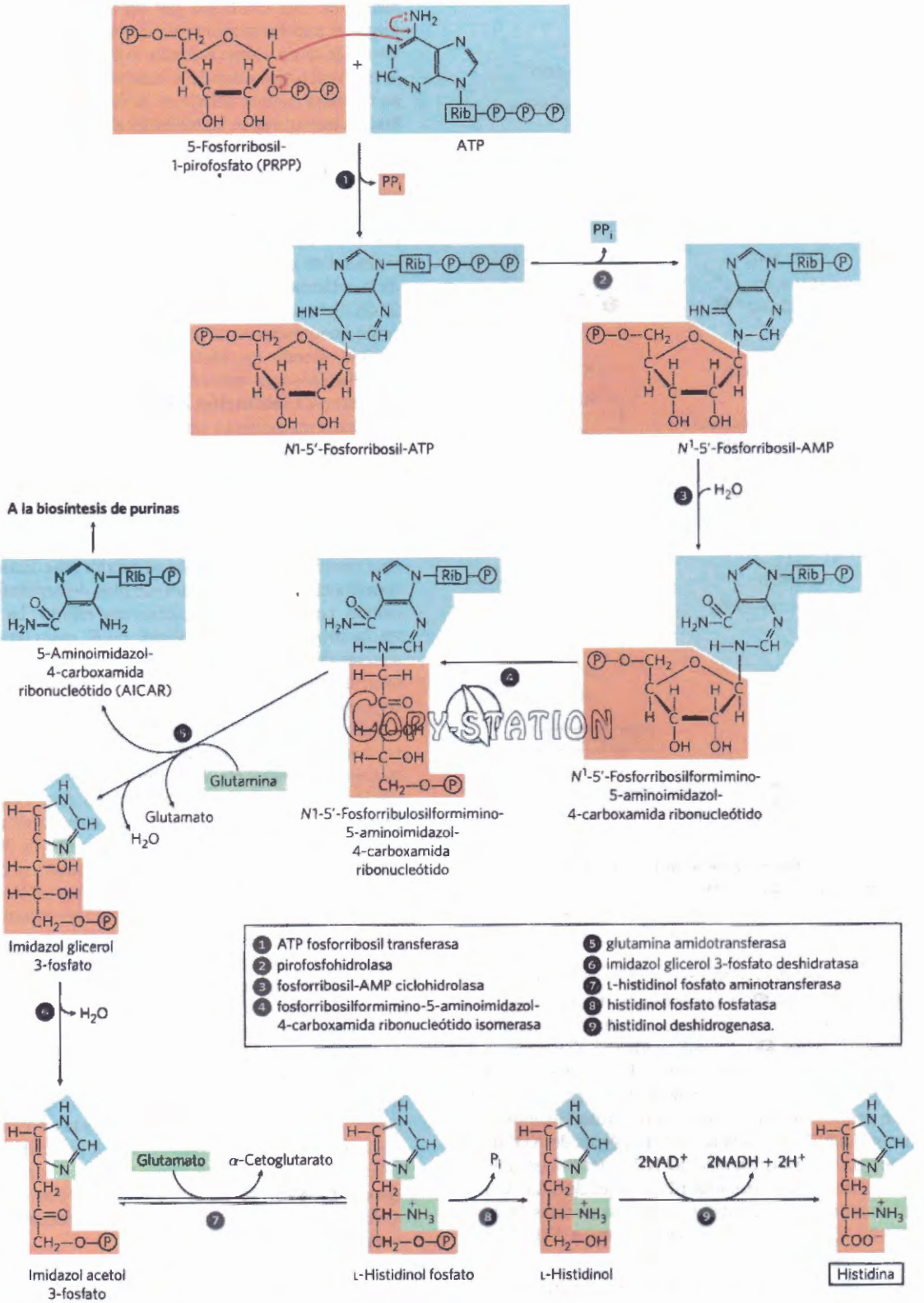


FIGURA 22-22 Biosíntesis de la histidina en bacterias y plantas. Los átomos que proceden del PRPP y el ATP están sombreados en rosa y azul, respectivamente. Dos de los nitrógenos de la histidina provienen de la glutamina y del glutamato (en verde). Observe que el derivado del ATP que se forma tras el paso ❺ (AICAR) es un intermediario en la biosíntesis de purinas (véase la Fig. 22-35, paso ❾), de modo que el ATP se regenera rápidamente.

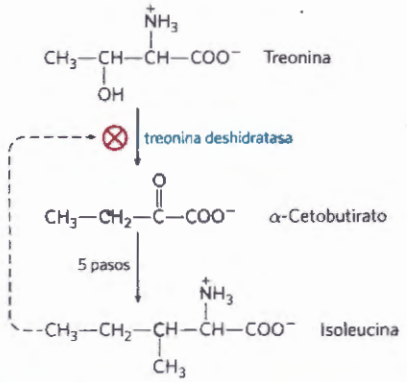


FIGURA 22-23 Regulación alostérica de la biosíntesis de isoleucina. La primera reacción en la vía que va de la treonina a la isoleucina está inhibida por el producto final, la isoleucina. Éste fue uno de los primeros ejemplos de retroinhibición alostérica descubiertos. Los pasos del α-cetobutirato hasta la isoleucina corresponden a los pasos ⓲ a ㉑ de la Fig. 22-17 (cinco pasos porque el ⓳ es una reacción en dos etapas).

global responda a las necesidades celulares de uno o más aminoácidos. Hay puntos de regulación adicionales después de que la vía se ramifique en el corismato. Por ejemplo, los enzimas que catalizan los dos primeros pasos de la rama del triptófano están sujetos a inhibición alostérica por el triptófano.

RESUMEN 22.2 Biosíntesis de los aminoácidos

- Las plantas y las bacterias sintetizan los 20 aminoácidos estándar. Los mamíferos pueden sintetizar alrededor de la mitad; los restantes son necesarios en la dieta (aminoácidos esenciales).
- Entre los aminoácidos no esenciales, el glutamato se forma por aminación reductora del α-cetoglutarato y sirve de precursor de la glutamina, prolina y arginina. La alanina y el aspartato (y, por tanto, la asparagina) se forman a partir del piruvato y el oxalacetato, respectivamente, por transaminación. La cadena carbonada de la serina procede del 3-fosfoglicerato. La serina es un precursor de la glicina; el átomo de carbono β de la serina se transfiere al tetrahidrofolato. En los microorganismos, la cisteína se sintetiza a partir de serina y del sulfuro producido por reducción del sulfato ambiental. Los mamíferos sintetizan la cisteína a partir de la metionina y de la serina mediante una serie de reacciones que requieren *S*-adenosilmetionina y cistationina.
- Entre los aminoácidos esenciales, los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) se forman a través de una ruta en la que el corismato ocupa un punto clave de ramificación. El fosforribosil pirofosfato es un precursor del triptófano y de la histidina. La ruta hasta la histidina está interconectada con la vía de síntesis de purinas. La tirosina también se puede formar por hidroxilación a partir de la fenilalanina (por lo que se considera condicionalmente esencial). Las rutas hacia los restantes aminoácidos esenciales son complejas.
- Las rutas de biosíntesis de los aminoácidos están sujetas a inhibición alostérica por producto final; el enzima regulador es habitualmente el primero de la secuencia. La regulación de las diversas rutas biosintéticas está coordinada.

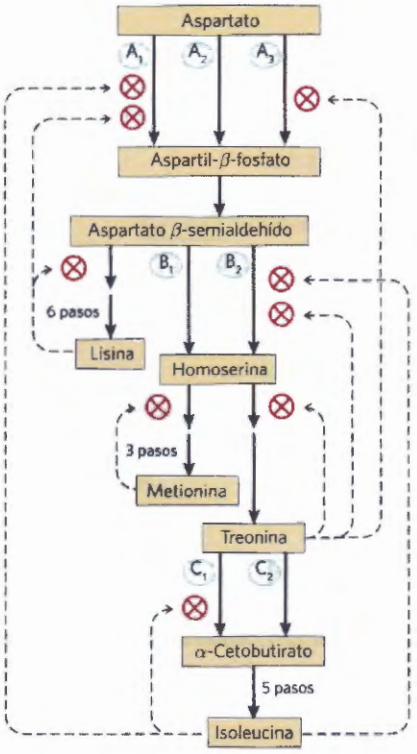


FIGURA 22-24 Interconexión de los mecanismos de regulación de la biosíntesis de varios aminoácidos derivados del aspartato en *E. coli*. Tres enzimas (A, B, C) poseen dos o tres formas isozimáticas, indicadas por subíndices numéricos. En cada caso, uno de los isozimas (A_2, B, y C_1) no posee regulación alostérica; estos isozimas se regulan por cambios en las cantidades sintetizadas a nivel de la expresión génica (Capítulo 28). La síntesis de los isozimas A_2 y B_1 se reprime cuando los niveles de metionina son altos y la síntesis del isozima C_2 se reprime cuando son elevados los niveles de isoleucina. El enzima A es la aspartoquinasa; el B, la homoserina deshidrogenasa; el C, la treonina deshidratasa.

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

Además de su papel como bloques de construcción de las proteínas, los aminoácidos son los precursores de muchas biomoléculas especializadas, entre las que se encuentran hormonas, coenzimas, nucleótidos, alcaloides, polímeros de las paredes celulares, porfirinas, antibióticos, pigmentos y neurotransmisores. Se describirán a continuación las rutas biosintéticas de algunos de estos derivados de los aminoácidos.

La glicina es un precursor de las porfirinas

La biosíntesis de las **porfirinas**, de las que la glicina es un precursor principal, constituye nuestro primer ejemplo por la importancia central del núcleo de porfirina para las hemoproteínas, tales como la hemoglobina y los citocromos. Las porfirinas se fabrican a partir de cuatro moléculas del derivado monopirrólico **porfobilinógeno** que, a su vez, procede de dos moléculas de δ-aminolevulinato. Existen dos rutas principales para el δ-aminolevulinato. En los eucariotas superiores **(Fig. 22-25a)** la glicina reacciona con el succinil-CoA en el primer paso para dar α-amino-β-cetoadipato, que a continuación se descarboxila para dar δ-aminolevulinato. En las

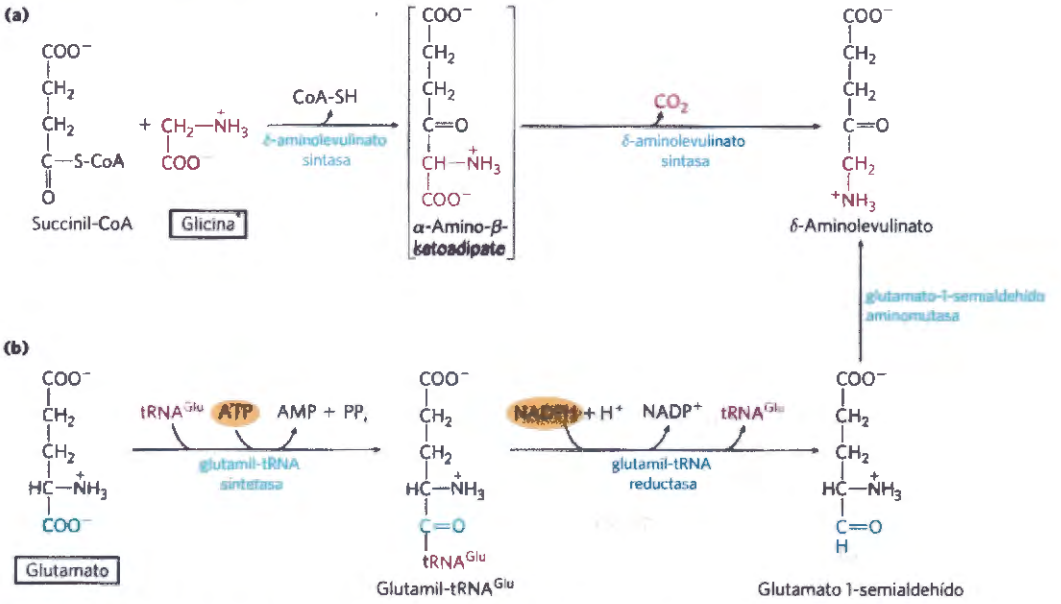


FIGURA 22-25 Biosíntesis de δ-aminolevulinato. **(a)** En la mayoría de animales, mamíferos incluidos, el δ-aminolevulinato se sintetiza a partir de glicina y succinil-CoA. Los átomos aportados por la glicina se muestran en rojo. **(b)** En bacterias y plantas, el glutamato es el precursor del δ-aminolevulinato.

plantas, algas y mayoría de bacterias, el δ-aminolevulinato se forma a partir del glutamato (Fig. 22-25b). El glutamato se esterifica primero a glutamil-tRNA^{Glu} (consúltese el Capítulo 27 para el tema de los RNA de transferencia); la reducción mediante NADPH convierte el glutamato en glutamato 1-semialdehído, que es cortado del tRNA. Una aminotransferasa convierte el glutamato 1-semialdehído en δ-aminolevulinato.

En todos los organismos se condensan dos moléculas de δ-aminolevulinato para formar porfobilinógeno y, a través de una serie de reacciones enzimáticas complejas, se unen cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar **protoporfirina (Fig. 22-26)**. El átomo de hierro se incorpora después de la formación de la protoporfirina, en una etapa catalizada por la ferroquelatasa. La biosíntesis de la porfirina se regula en los eucariotas superiores por la concentración del producto hemo, que actúa como retroinhibidor de los primeros pasos de la ruta de biosíntesis. Defectos genéticos en la biosíntesis de porfirinas pueden dar lugar a la acumulación de intermediarios de la ruta, que provocan diversas enfermedades humanas conocidas genéricamente como **porfirias** (Recuadro 22-2).

El hemo es la fuente de los pigmentos biliares

La ferroporfirina (hemo) de la hemoglobina, liberada en el bazo por los eritrocitos muertos, se degrada proporcionando Fe^{3+} libre y finalmente **bilirrubina**. Esta ruta también produce el color presente en las mezclas de sales biliares derivadas del colesterol (véase la Figura 21-38).

El primer paso en la ruta de dos pasos que conduce a la bilirrubina, catalizado por la hemo oxigenasa, convierte el hemo en biliverdina, un derivado tetrapirrólico lineal (abierto) **(Fig. 22-27)**. Los otros productos de la reacción son Fe^{2+} y CO. El Fe^{2+} se une rápidamente a la ferritina. El monóxido de carbono es un veneno que se une a la hemoglobina (véase el Recuadro 5-1), y la producción de CO por la hemo oxigenasa asegura que, incluso en ausencia de exposición al ambiente, alrededor de un 1% del hemo de un individuo esté unido al CO. La biliverdina se convierte en bilirrubina en el segundo paso, catalizado por la biliverdina reductasa. Esta reacción se puede seguir colorimétricamente en un experimento familiar in situ. Cuando se sufre una contusión el color negro y/o púrpura que aparece se debe a la hemoglobina liberada por los eritrocitos dañados. Con el tiempo, el color pasa al verde de la biliverdina y posteriormente al amarillo de la bilirrubina. La bilirrubina es muy insoluble y viaja por el torrente sanguíneo unida a la seroalbúmina. En el hígado, la bilirrubina se transforma en el pigmento biliar bilirrubina diglucurónido. Este producto es lo bastante hidrosoluble para ser secretado, junto a otros componentes de la bilis, en el intestino delgado, donde enzimas microbianos lo convierten en varios productos, mayoritariamente urobilinógeno. Parte del urobilinógeno se reabsorbe en la sangre y se transporta al riñón en donde se convierte en urobilina, el compuesto que da a la orina su color amarillo (Fig. 22-27). El urobilinógeno que permanece en el intestino se convierte (en otra reacción dependiente de microbios) en estercobilina (Fig. 22-27), que da a las heces el color marrón rojizo.

Un mal funcionamiento hepático o un bloqueo de la secreción biliar es causa de que la bilirrubina llegue desde el hígado a la sangre, lo que produce el amarilleo de la piel y del globo ocular, dolencia conocida como ictericia. La determinación de la concentración sanguínea de bilirrubina en los casos de ictericia es útil para el diagnóstico de la enfermedad hepática subyacente. Los recién nacidos tienen, a veces, ictericia debido a que no han producido aún suficiente glucuronil bilirrubina transferasa para modificar su bilirrubina. Un tratamiento tradicional para disminuir el exceso de bilirrubina

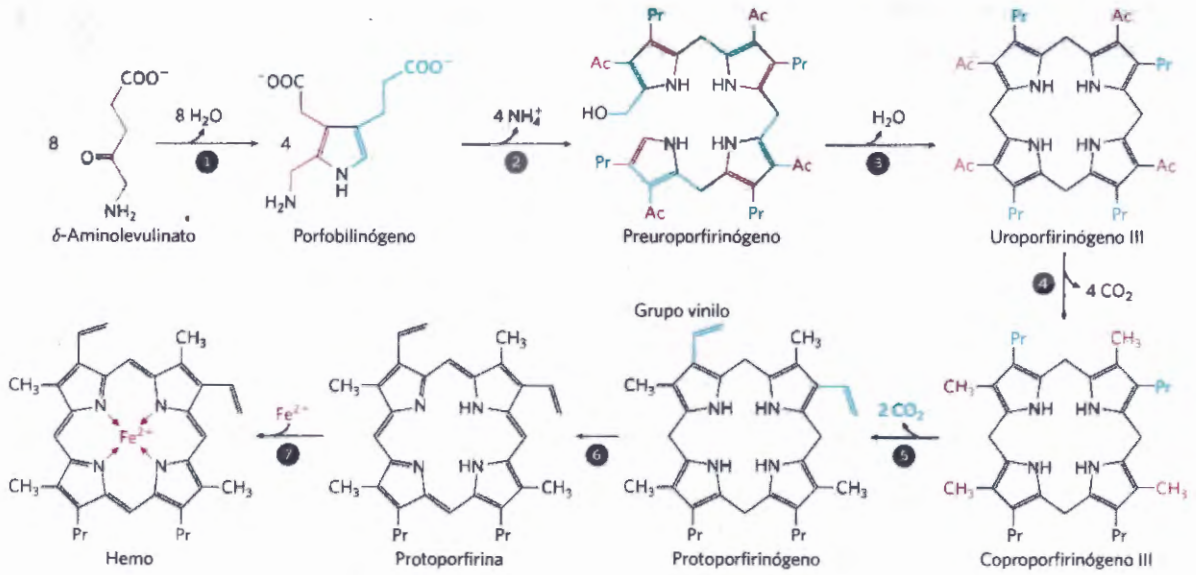
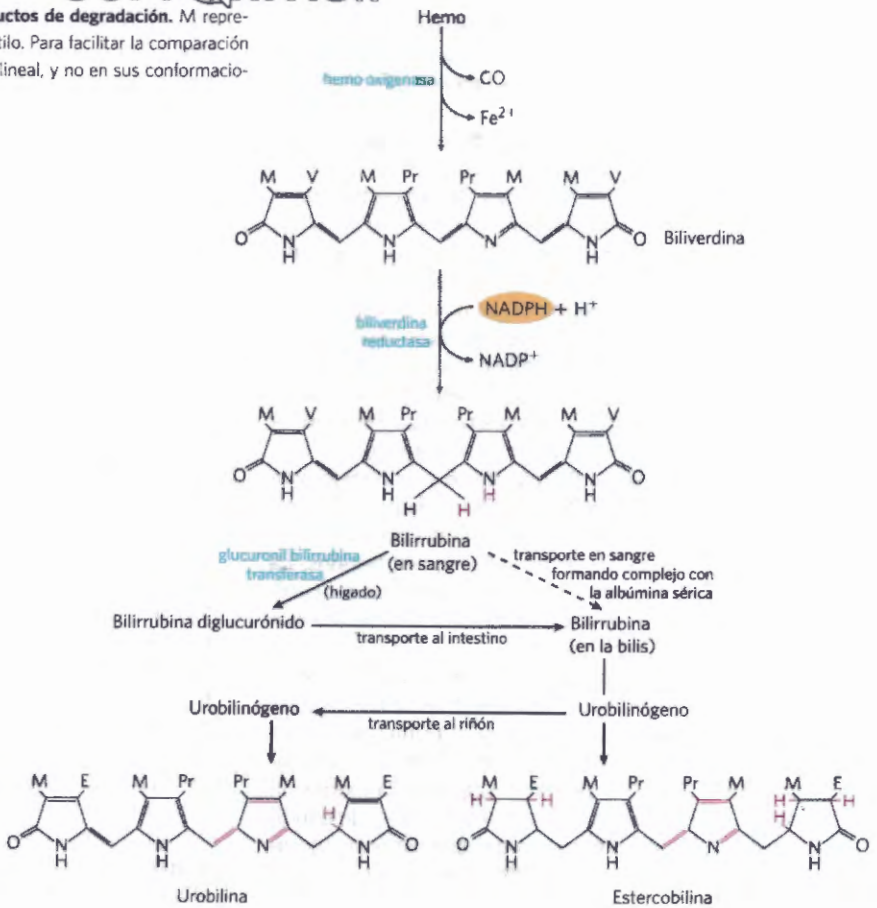


FIGURA 22-26 Biosíntesis de hemo a partir de δ-aminolevulinato. Ac representa acetilo ($-CH_2COO^-$); Pr, propionilo ($-CH_2CH_2COO^-$).

1. porfobilinógeno sintasa
2. uroporfirinógeno sintasa
3. uroporfirinógeno III cosintasa
4. uroporfirinógeno descarboxilasa
5. coproporfirinógeno oxidasa
6. protoporfirinógeno oxidasa
7. ferroquelatasa

COPY-STATION

FIGURA 22-27 Bilirrubina y sus productos de degradación. M representa metilo; V, vinilo; Pr, propionilo; E, etilo. Para facilitar la comparación estas estructuras se muestran en forma lineal, y no en sus conformaciones estereoquímicas correctas.

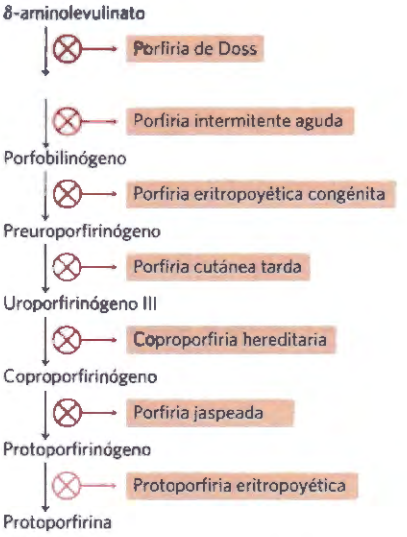


RECUADRO 22-2 MEDICINA Sobre reyes y vampiros

Las porfirias son un grupo de enfermedades genéticas que son el resultado de defectos en enzimas de la ruta biosintética de las porfirinas a partir de la glicina; en los eritrocitos, fluidos corporales e hígado se acumulan precursores específicos de las porfirinas. La forma más común es la porfiria intermitente aguda. La mayoría de los afectados son heterocigotos y normalmente son asintomáticos, porque una sola copia del gen normal garantiza un nivel suficiente de actividad enzimática. Sin embargo, ciertos factores ambientales o nutricionales (aún poco conocidos) pueden ser causa de una acumulación de δ-aminolevulinato y de porfobilinógeno que produce ataques de dolor abdominal agudo y disfunciones neurológicas. El rey Jorge III, monarca británico durante la Revolución Americana, sufrió varios ataques de locura aparente, que perjudicaron la imagen de un hombre por lo demás inteligente y sensato. Los síntomas de su dolencia sugieren que Jorge III sufría porfiria intermitente aguda.

Una de las porfirias más infrecuentes da lugar a la acumulación de uroporfirinógeno I, un isómero anormal de un precursor de la protoporfirina. Este compuesto tiñe la orina de rojo, provoca una fuerte fluorescencia de los dientes a la luz ultravioleta y hace que la piel sea anormalmente sensible a la luz solar. Muchos individuos con esta porfiria son anémicos porque no se sintetiza suficiente hemo. Esta dolencia genética puede haber originado el mito popular de los vampiros.

Los síntomas de la mayoría de las porfirias son hoy día fácilmente controlables con cambios en la dieta o con administración de hemo o hemoderivados.



COPY-STATION

consiste en la exposición a una lámpara fluorescente, que produce una conversión fotoquímica de la bilirrubina en compuestos que son más solubles y que se excretan más fácilmente.

Estas rutas de degradación del hemo juegan papeles significativos en la protección de las células contra las lesiones oxidativas y en la regulación de ciertas funciones celulares. El CO producido por la hemo oxigenasa es tóxico a concentraciones elevadas, pero a las concentraciones extremadamente bajas generadas durante la degradación del hemo podría tener una función reguladora y/o señalizadora. Tiene un efecto vasodilatador, muy parecido (aunque menos potente) que el óxido nítrico (que se discute más adelante). Concentraciones bajas de CO también tienen algunos efectos reguladores sobre la neurotransmisión. La bilirrubina es el antioxidante más abundante en los tejidos de mamíferos y es responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante del suero. Sus efectos protectores parecen ser muy importantes en el desarrollo del cerebro de los niños recién nacidos. La toxicidad celular asociada con la ictericia puede ser debida a niveles de bilirrubina superiores a la albúmina sérica necesaria para solubilizarla.

Debido a estas variadas misiones de los productos de degradación del hemo, la ruta degradativa está sujeta a regulación, principalmente en el primer paso. Los humanos tienen al menos tres isozimas de la hemo oxigenasa (HO). La HO-1 está muy regulada; la expresión de su gen está inducida por una amplia gama de condiciones de estrés (estrés traumático, angiogénesis (desarrollo incontrolado de los vasos sanguíneos), hipoxia, hiperoxia, choque térmico, exposición a la luz ultravioleta, peróxido de hidrógeno y otras muchas agresiones metabólicas). La HO-2 se encuentra principalmente en el cerebro y en los testículos en donde se expresa de manera continua. El tercer isozima, HO-3, aún no está bien caracterizado. ■

La biosíntesis de la creatina y del glutatión se realiza a partir de aminoácidos

La **fosfocreatina**, derivada de la **creatina**, constituye una importante amortiguador energético en el músculo esquelético (véase el Recuadro 23-2). La creatina se sintetiza a partir de la glicina y la arginina **(Fig. 22-28)**; la metionina, en forma de *S*-adenosilmetionina, es el dador del grupo metilo.

El **glutatión (GSH),** presente en plantas, animales y en algunas bacterias, a menudo en altas concentraciones, puede ser considerado como un amortiguador redox. Procede del glutamato cisteína y glicina **(Fig. 22-29)**. El grupo γ-carboxilo del glutamato se activa con ATP para formar un intermediario acil fosfato que, a continuación, es atacado por el grupo α-amino de la cisteína. Sigue una segunda reacción de condensación, con el grupo α-carboxilo de la cisteína activado como acil fosfato para permitir la reacción con la glicina. La forma oxidada del glutatión (GSSG), producida en el transcurso de sus actividades redox, contiene dos moléculas de glutatión unidas mediante un puente disulfuro.

El glutatión ayuda probablemente a mantener los grupos sulfhidrilo de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en estado ferroso (Fe^{2+}), y tam-

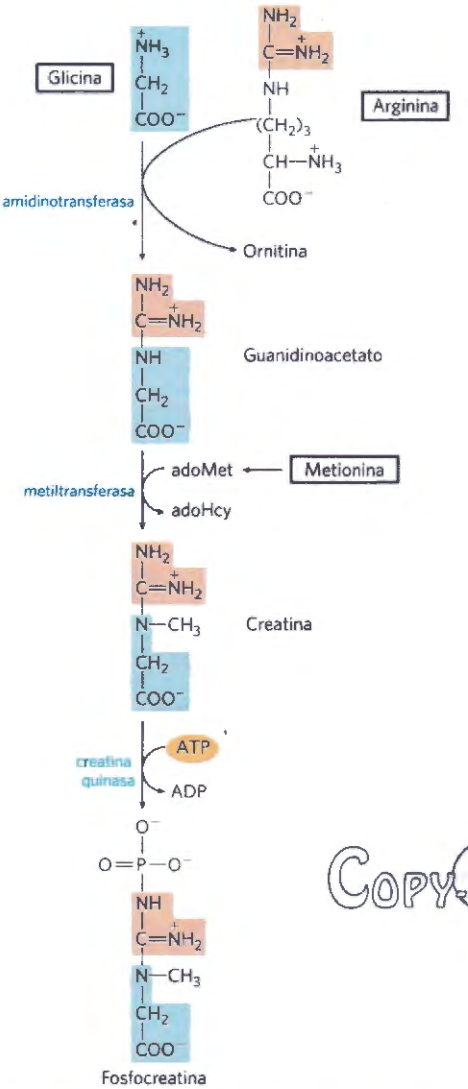


FIGURA 22-28 Biosíntesis de creatina y fosfocreatina. La creatina se forma a partir de tres aminoácidos: glicina, arginina y metionina. Esta vía muestra la versatilidad de los aminoácidos como precursores en la biosíntesis de otras biomoléculas nitrogenadas.

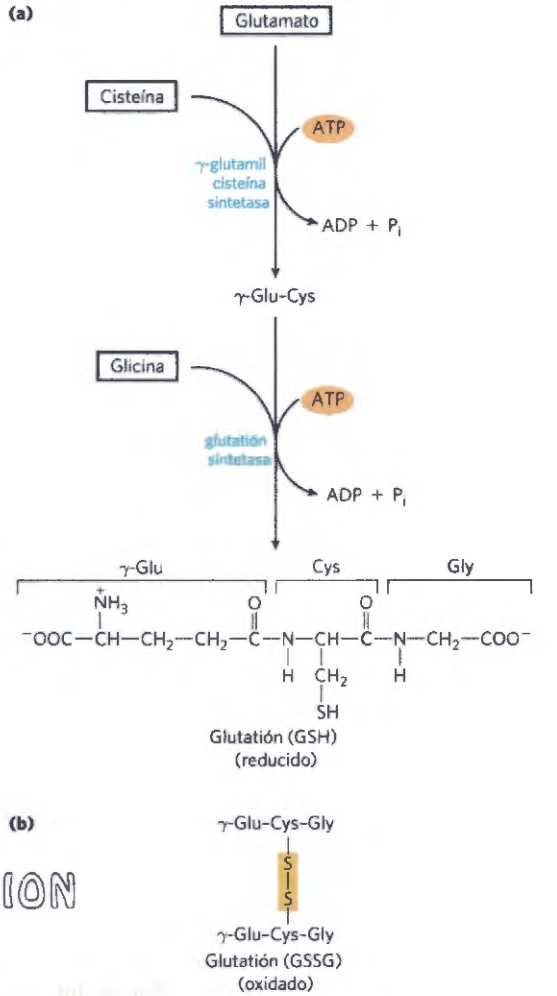


FIGURA 22-29 Metabolismo del glutatión. (a) Biosíntesis del glutatión. **(b)** Forma oxidada del glutatión.

COPY-STATION

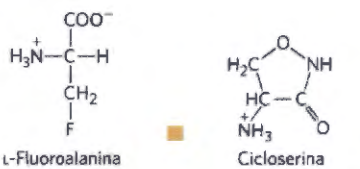
bién actúa como agente reductor de la glutarredoxina en la síntesis de desoxirribonucleótidos (véase la Fig. 22-41). Su acción redox también se usa para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones aeróbicas:

$$2GSH + R{-}O{-}O{-}H \longrightarrow GSSG + H_2O + R{-}OH$$

Esta reacción está catalizada por la **glutatión peroxidasa,** un enzima que tiene la peculiaridad de contener un átomo de selenio (Se), unido covalentemente en forma de selenocisteína (véase la Fig. 3-8a), que es esencial para su actividad.

Los D-aminoácidos se encuentran fundamentalmente en las bacterias

Aunque los D-aminoácidos no se encuentran generalmente en las proteínas, tienen algunas funciones especiales en la estructura de las paredes celulares bacterianas y de los antibióticos peptídicos. Los peptidoglucanos de las bacterias (véase la Fig. 6-30) contienen D-alanina y D-glutamato. Los D-aminoácidos se forman directamente a partir de los isómeros L por acción de aminoácido racemasas, que usan piridoxal fosfato como cofactor (véase la Fig. 18-6). La racemización de los aminoácidos es un proceso importante solamente en el metabolismo bacteriano, por lo que enzimas tales como la alanina racemasa son objetivos fundamentales de agentes farmacológicos. Un agente de este tipo, la **L-fluoroalanina**, está siendo estudiado como fármaco bactericida. Otro compuesto, la **cicloserina**, se utiliza para tratar la tuberculosis. Puesto que estos inhibidores también afectan a algunos enzimas que precisan PLP en humanos, pueden presentar efectos secundarios indeseables.



Los aminoácidos aromáticos son precursores de muchos compuestos presentes en los vegetales

En las plantas, la fenilalanina, tirosina y triptófano se convierten en toda una serie de compuestos importantes. El polímero rígido **lignina** procede de la fenilalanina y de la tirosina. En los tejidos vegetales, sólo es superado en abundancia por la celulosa. La estructura del polímero de lignina es compleja y no totalmente conocida. El triptófano es también el precursor de la hormona de crecimiento vegetal indol-3-acetato, o **auxina (Fig. 22-30a)**, que ha sido relacionada con la regulación de una amplia gama de procesos biológicos en las plantas.

La fenilalanina y la tirosina dan lugar también a toda una gama de productos naturales comerciales importantes, tales como los taninos, que inhiben la oxidación del vino; alcaloides tales como la morfina, que tienen potentes efectos fisiológicos y los sabores de la esencia de canela (Fig. 22-30b), la nuez moscada, el clavo, la vainilla, la pimienta y otros productos.

Las aminas biógenas son productos de descarboxilación de los aminoácidos

Muchos neurotransmisores importantes son aminas primarias o secundarias que se forman a partir de aminoácidos mediante rutas sencillas. Además, algunas poliaminas que forman complejos con el DNA proceden del aminoácido ornitina, un componente del ciclo de la urea. Un denominador común de muchas de estas vías es la descarboxilación de los aminoácidos, otra reacción que requiere PLP (véase la Fig. 18-6).

La síntesis de algunos neurotransmisores se muestra en la **Figura 22-31**. La tirosina da lugar a una familia de catecolaminas, que incluye la **dopamina**, la **norepinefrina** y la **epinefrina**. Los niveles de catecolaminas están relacionados (entre otros aspectos) con los cambios de presión sanguínea. La enfermedad neurológica de Parkinson está relacionada con una producción insuficiente de dopamina, y ha sido tratada tradicionalmente con administración de L-dopa. La sobreproducción de dopamina en el cerebro se ha relacionado con alteraciones psíquicas tales como la esquizofrenia.

La descarboxilación del glutamato da lugar al **γ-aminobutirato (GABA),** un neurotransmisor inhibidor. La falta de GABA está relacionada con los ataques epilépticos. Se utilizan análogos del GABA para el tratamiento de la epilepsia y de la hipertensión. Los niveles de GABA también pueden ser incrementados administrando inhibidores del enzima encargado de su degradación, la GABA aminotransferasa. Otro neurotransmisor importante, la **serotonina**, se forma en dos pasos a partir del triptófano.

La histidina se descarboxila para dar lugar a la **histamina**, un potente vasodilatador presente en los tejidos animales. La liberación de histamina en grandes cantidades forma parte de la respuesta alérgica. La histamina estimula también la secreción ácida del estómago. Existe una gran variedad de compuestos farmacológicos diseñados para interferir con la síntesis o con la acción de la histamina. Un ejemplo destacable es un antagonista del receptor de histamina, la **cimetidina** (Tagamet), análogo estructural de la histamina:

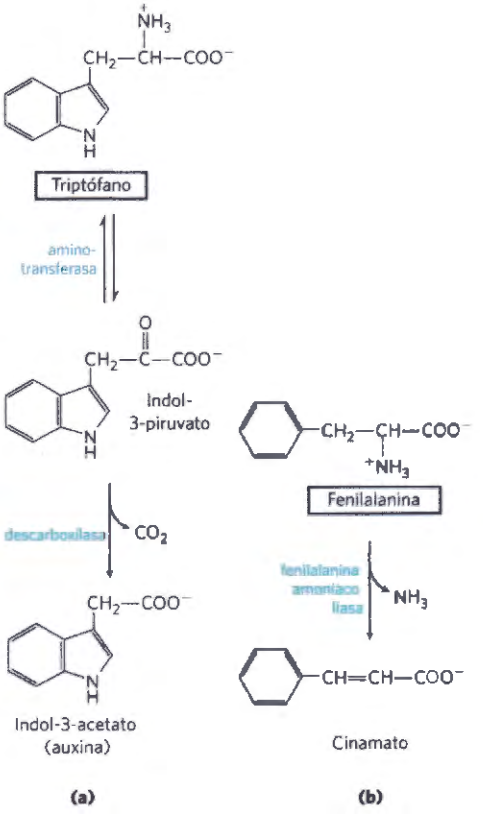
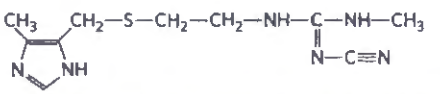


FIGURA 22-30 Biosíntesis de dos sustancias vegetales a partir de aminoácidos. (a) Indol-3-acetato (auxina) y (b) cinamato (esencia de canela).

COPYSTATION



Favorece la curación de las úlceras duodenales al inhibir la secreción de ácido gástrico.

Las poliaminas, tales como la **espermina** y la **espermidina**, que tienen un papel en el empaquetamiento del DNA, proceden de la metionina y de la ornitina por la vía que se muestra en la **Figura 22-32**. El primer paso es la descarboxilación de la ornitina, precursor de la arginina (Fig. 22-12). La **ornitina descarboxilasa,** un enzima que precisa PLP, es la diana de varios inhibidores potentes usados como agentes farmacológicos (Recuadro 6-3). ■

La arginina es el precursor de la síntesis biológica del óxido nítrico

Un hallazgo sorprendente acaecido a mediados de la década de 1980 fue que el óxido nítrico (NO), antes conocido principalmente como contaminante atmosférico, tenía un papel como importante mensajero biológico. Esta sustancia gaseosa sencilla difunde fácilmente a través de las membranas, aunque su elevada reactividad limita su difusión a un radio de aproximadamente 1 mm desde el sitio de síntesis. En los humanos, el NO participa en una amplia gama de procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la neurotransmisión, la coagulación sanguínea y el control de la presión sanguínea. Su modo

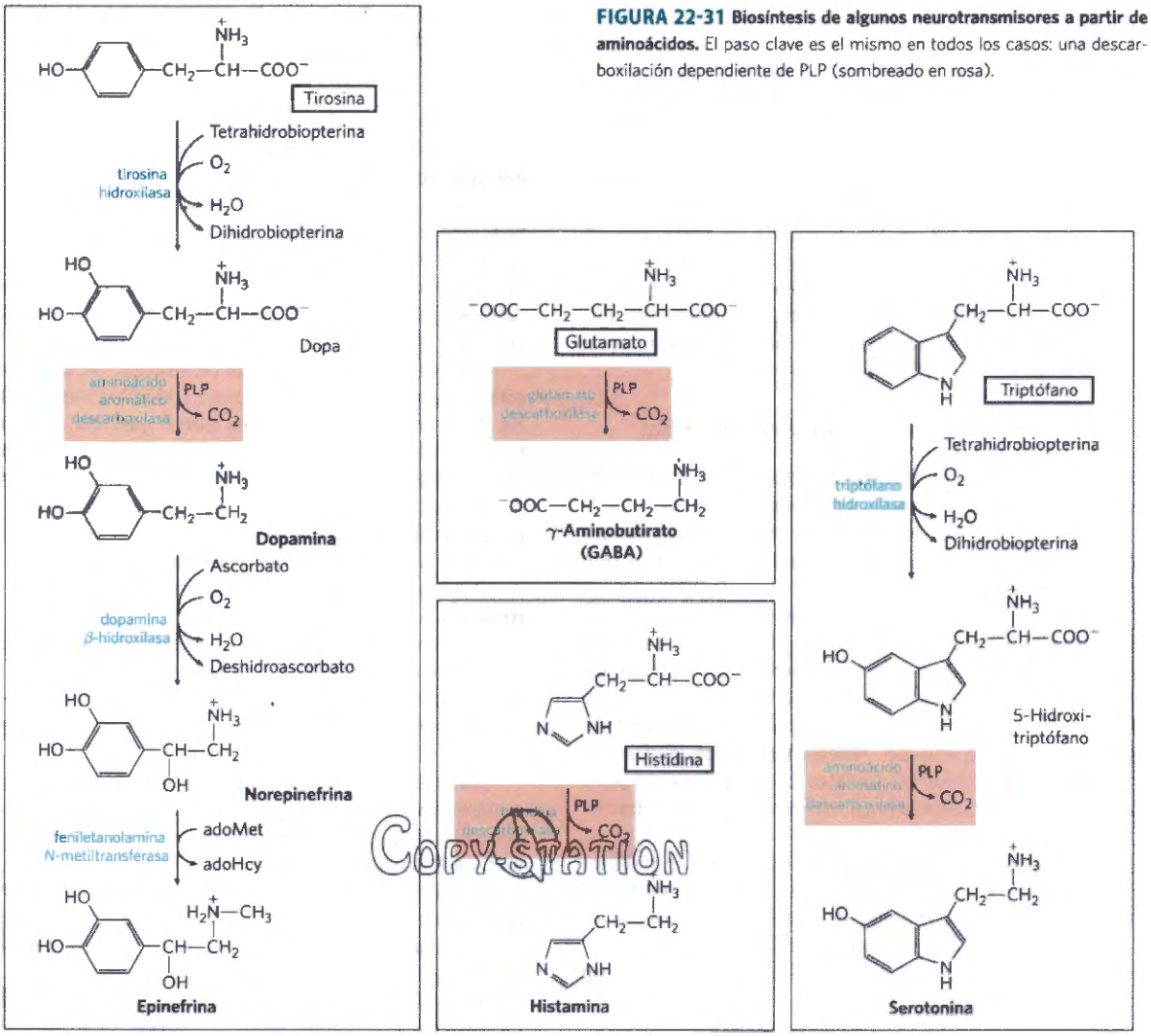


FIGURA 22-31 Biosíntesis de algunos neurotransmisores a partir de aminoácidos. El paso clave es el mismo en todos los casos: una descarboxilación dependiente de PLP (sombreado en rosa).

COPY-STATION

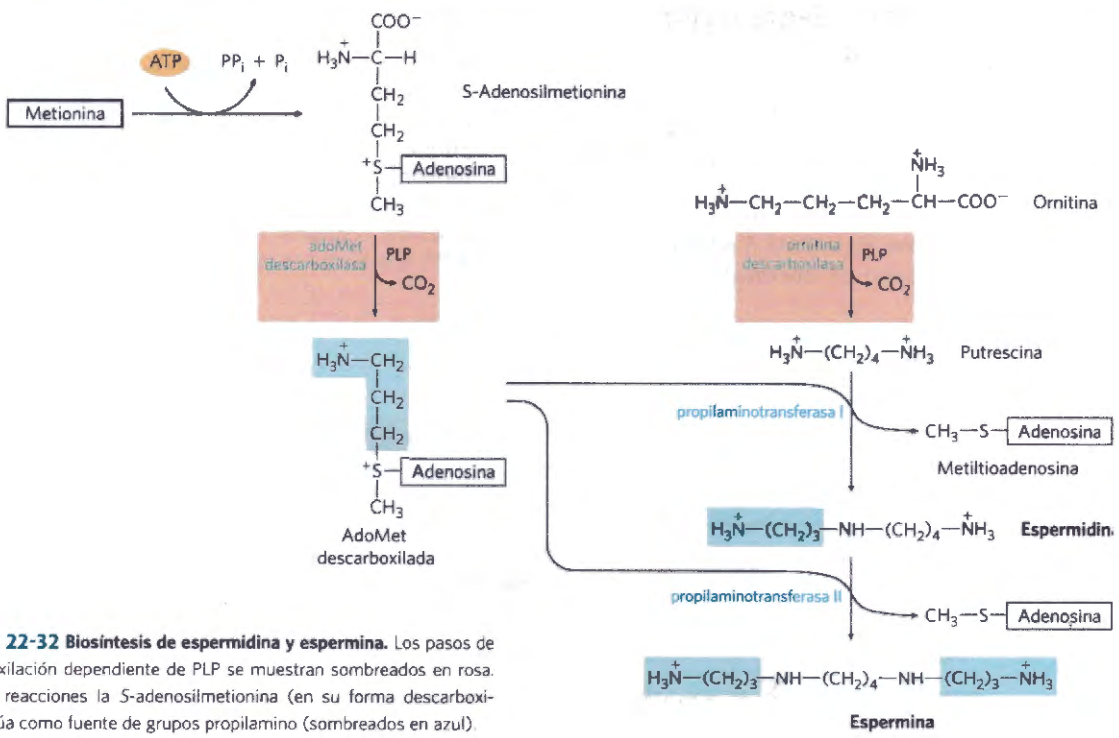


FIGURA 22-32 Biosíntesis de espermidina y espermina. Los pasos de descarboxilación dependiente de PLP se muestran sombreados en rosa. En estas reacciones la *S*-adenosilmetionina (en su forma descarboxilada) actúa como fuente de grupos propilamino (sombreados en azul).

de acción se describe en el Capítulo 12 (véase la Sección 12.5°).

El óxido nítrico se sintetiza a partir de arginina en una reacción dependiente de NADPH, catalizada por la óxido nítrico sintasa **(Fig. 22-33)**, un enzima dimérico estructuralmente relacionado con la NADPH citocromo P-450 reductasa (véase el Recuadro 21-1). La reacción es una oxidación de cinco electrones. Cada subunidad del enzima lleva unida una molécula de cada uno de estos cuatro cofactores diferentes: FMN, FAD, tetrahidrobiopterina y hemo Fe^{3+}. El NO es una molécula inestable y no puede ser almacenada. Su síntesis es estimulada por la interacción de la óxido nítrico sintasa con la Ca^{2+}-calmodulina (véase la Fig. 12-12).

RESUMEN 22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

- Muchas biomoléculas importantes son derivados de aminoácidos. La glicina es un precursor de las porfirinas. La degradación de la ferroporfirina (hemo) genera bilirrubina, que se convierte en pigmentos biliares que tienen diversas funciones fisiológicas.
- La glicina y la arginina producen creatina y fosfocreatina que es un amortiguador energético. El glutatión, formado a partir de tres aminoácidos, es un agente reductor celular importante.
- Las bacterias sintetizan D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos mediante reacciones de racemización que requieren piridoxal fosfato. Los D-aminoácidos se encuentran frecuentemente en ciertas paredes bacterianas y ciertos antibióticos.
- Los aminoácidos aromáticos dan lugar a muchas sustancias vegetales. La descarboxilación dependiente de PLP de algunos aminoácidos produce aminas biógenas importantes, incluidos neurotransmisores.
- La arginina es el precursor del óxido nítrico, un mensajero biológico.

22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos

Tal como se comentó en el Capítulo 8, los nucleótidos desempeñan una amplia variedad de funciones en todas las células. Son los precursores del DNA y del RNA. El ATP, y en cierta medida el GTP, son los principales transportadores de la energía química. Son componentes de los cofactores NAD, FAD, *S*-adenosilmetionina y coenzima A, así como de intermediarios biosintéticos activados tales como la UDP-glucosa y el CDP-diacilglicerol. Algunos nucleótidos, tales como el cAMP y el cGMP, actúan también como segundos mensajeros celulares.

Hay dos tipos de vías que conducen a la formación de los nucleótidos: las **rutas de novo** y las **rutas de recuperación**. La síntesis de novo de los nucleótidos empieza a partir de sus precursores metabólicos: aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO_2 y NH_3. Las vías de recuperación reciclan las bases libres y los nucleósidos liberados de la degradación de los ácidos nucleicos. Ambos tipos de vías son importantes en el metabolismo celular y ambos se discuten en esta sección.

Las vías de novo para la biosíntesis de purinas y pirimidinas son casi idénticas en todos los seres vivos. Es de destacar que las bases libres guanina, adenina, timina, citidina y uracilo *no* son intermediarios en estas vías; es decir, no se sintetizan las bases y a continuación se unen a la ribosa, como podría esperarse. La estructura del anillo de purina se construye añadiendo uno o unos pocos átomos a la vez a la ribosa a lo largo de todo el proceso. El anillo de pirimidina se sintetiza como **orotato,** unido a ribosa fosfato, y a continuación se convierte en los nucleótidos de pirimidina comunes que se utilizan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Aunque las bases libres no son intermediarios en las vías de síntesis de novo, pueden serlo en algunas vías de recuperación.

Las vías de síntesis de novo de purinas y pirimidinas comparten varios precursores importantes. El fosforribosil pirofosfato (PRPP) es importante en ambos casos, y en estas vías la estructura de la ribosa se mantiene en el nucleótido sintetizado, a diferencia de lo descrito anteriormente en la síntesis del triptófano y de la histidina. En cada vía un aminoácido es un precursor importante: la glicina para las purinas y el aspartato para las pirimidinas. Una vez más, la glutamina es la fuente más importante de grupos amino, jugando este papel en cinco pasos distintos de la vía de novo. El aspartato también se utiliza dos veces como fuente de un grupo amino en las vías de las purinas.

Otros dos aspectos merecen ser mencionados. Primero, hay pruebas, sobre todo en la vía de novo de las purinas, de que en la célula los enzimas implicados forman parte de grandes complejos multienzimáticos, un tema recurrente en el metabolismo. Segundo, las reservas celulares de nucleótidos (a excepción del ATP) son bastante pequeñas, tal vez un 1% o menos de

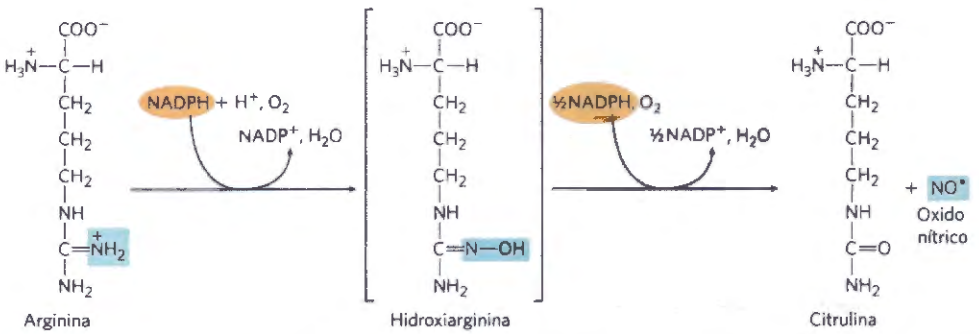


FIGURA 22-33 Biosíntesis del oxido nítrico. Ambos pasos están catalizados por la óxido nítrico sintasa. El nitrógeno del NO procede del grupo guanidinio de la arginina.



John M. Buchanan, 1917–2007 [Fuente: Cortesía de MIT Museum.]

las cantidades necesarias para sintetizar el DNA celular. Por ello, las células han de continuar sintetizando nucleótidos durante la síntesis de los ácidos nucleicos y, en algunos casos, la síntesis de nucleótidos puede ser un factor limitante de las velocidades de replicación y de transcripción del DNA. Debido a la gran importancia de estos procesos en las células en división, los agentes inhibidores de la síntesis de nucleótidos han adquirido una gran importancia en la medicina moderna.

Examinaremos a continuación las vías biosintéticas de los nucleótidos de purinas y pirimidinas y su regulación, la síntesis de desoxinucleótidos y la degradación de purinas y pirimidinas hasta ácido úrico y urea. Finalizaremos con una discusión de los agentes quimioterápicos que afectan a la síntesis de nucleótidos.

La síntesis de novo de los nucleótidos de purina empieza con el PRPP

Los dos nucleótidos de purina originales de los ácidos nucleicos son la adenosina 5'-monofosfato (AMP; adenilato) y la guanosina 5'-monofosfato (GMP; guanilato), que contienen las bases púricas adenina y guanina. La **Figura 22-34** muestra el origen de los átomos de carbono y de nitrógeno del sistema de anillos de la purina, tal como fue descrito por John Buchanan mediante el uso de marcadores isotópicos en aves. La vía de biosíntesis de las purinas fue descrita en detalle por primera vez por Buchanan y G. Robert Greenberg en la década de 1950.

En el primer paso determinante de la vía, un grupo amino, proporcionado por la glutamina, se une al C-1 del PRPP **(Fig. 22-35)**. La **5-fosforribosilamina** resultante es muy inestable, con una vida media de 30 segundos a pH 7,5. El anillo de purina se construye a continuación sobre esta estructura. La ruta aquí descrita es idéntica en todos los organismos, con la excepción de un paso que, tal como se menciona más adelante, es diferente en los eucariotas superiores.

El segundo paso consiste en la incorporación de tres átomos de la glicina (Fig. 22-35, paso ❷). Se gasta un ATP para activar el grupo carboxilo de la glicina (en forma de acil fosfato) para esta reacción de condensación. El grupo amino de la glicina incorporada se formila a continuación por acción del N^{10}-formiltetrahidrofolato ❸, y se incorpora un nitrógeno suministrado por la glutamina (paso ❹), antes que la deshidratación y el cierre del anillo den lugar al anillo de imidazol de cinco átomos del núcleo de la purina, en forma de 5-aminoimidazol ribonucleótido (AIR; paso ❺).

En este punto, tres de los seis átomos necesarios para la formación del segundo anillo de purina se hallan en la posición que les corresponde. Para completar el proceso se añade primero un grupo carboxilo (paso ❻). Se trata de una carboxilación poco habitual, puesto que no utiliza biotina, sino que se realiza a partir del

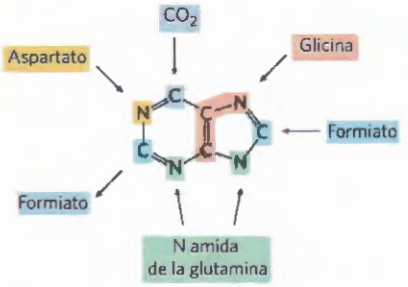


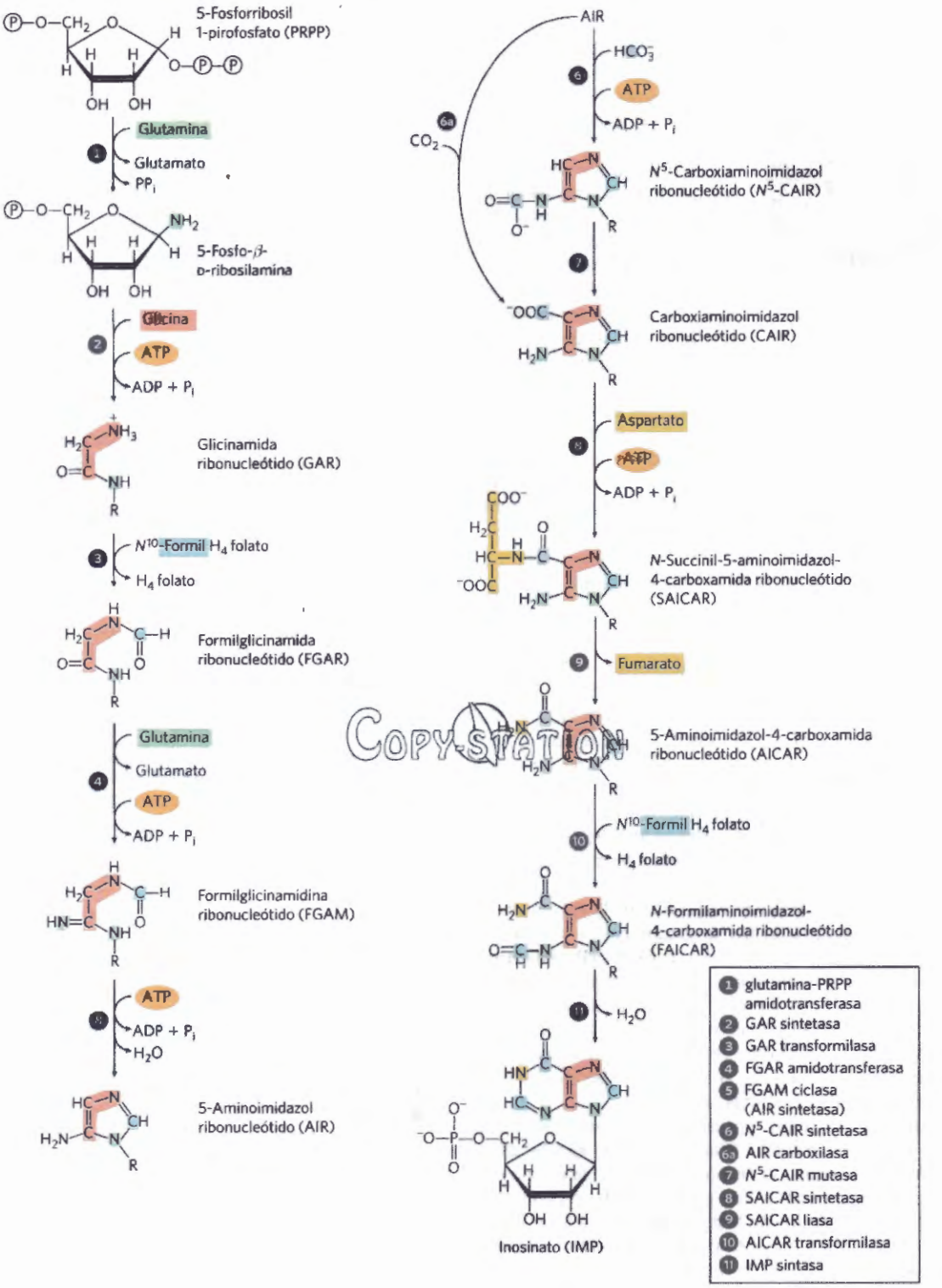
FIGURA 22-34 Origen de los átomos del anillo de las purinas. Esta información fue obtenida a partir de experimentos de marcaje isotópico con precursores marcados con ^{14}C o ^{15}N. El formiato se suministra en forma de N^{10}-formiltetrahidrofolato.

bicarbonato que se halla normalmente en las disoluciones acuosas. Una reorganización transfiere el carboxilato del grupo amino exocíclico a la posición 4 del anillo de imidazol (paso ❼). Los pasos ❻ y ❼ sólo se dan en bacterias y hongos. En los eucariotas superiores, incluidos los humanos, el 5-aminoimidazol ribonucleótido, producto del paso ❺ se carboxila directamente a carboxiaminoimidazol ribonucleótido en un solo paso en lugar de dos (paso ❻ₐ). El enzima que cataliza esta reacción es la AIR carboxilasa.

A continuación, el aspartato cede su grupo amino en dos pasos (❽ y ❾): formación de un enlace amida seguida de la eliminación del esqueleto carbonado del aspartato (en forma de fumarato). (Recuerde que el aspartato tiene un papel análogo en dos pasos del ciclo de la urea; véase la Fig. 18-10). El último átomo de carbono es proporcionado por el N^{10}-formiltetrahidrofolato (paso ❿), y a continuación tiene lugar la segunda ciclación que proporciona el segundo de los dos anillos fusionados del núcleo de purina (paso ⓫). El primer intermediario con un anillo purínico completo es el **inosinato (IMP).**

Al igual que en las vías biosintéticas del triptófano y la histidina, los enzimas de la síntesis del IMP parece que forman parte de grandes complejos multienzimáticos celulares. Prueba de ello, una vez más, es la existencia de polipéptidos con varias funciones en una única cadena, algunos de los cuales catalizan pasos no secuenciales de la vía. En las células eucarióticas, desde las levaduras a la mosca del vinagre o el pollo, los pasos ❶, ❸ y ❺ de la Figura 22-35 están catalizados por una proteína multifuncional. Otra proteína multifuncional cataliza los pasos ❿ y ⓫. En los humanos, un enzima multifuncional combina las actividades de la AIR carboxilasa y la SAICAR sintetasa (pasos ❻ₐ y ❽). En las bacterias estas actividades se hallan en proteínas separadas, pero las proteínas podrían formar un gran complejo no covalente. La canalización de los intermediarios de reacción desde un enzima hasta el siguiente, favorecida por estos complejos, es probablemente muy importante en el caso de intermediarios poco estables tales como la 5-fosforribosilamina.

La conversión del inosinato en adenilato requiere la incorporación de un grupo amino procedente del aspartato **(Fig. 22-36)**; ello tiene lugar en dos reacciones similares a las utilizadas para incorporar el N-1 del anillo de la purina (Fig. 22-35, pasos ❽ y ❾). Una diferencia clave consiste en la utilización de GTP, en lugar de ATP,



Copystation

FIGURA 22-35 Síntesis de novo de los nucleótidos de purina: construcción del anillo purínico del inosinato (IMP). Cada incorporación al anillo purínico está coloreada de la misma forma que en la Fig. 22-34. A partir del paso ❷, R simboliza el grupo 5-fosfo-D-ribosilo sobre el que se construye el anillo purínico. La formación de 5-fosforribosilamina (paso ❶) es el primer paso determinante de la síntesis de las purinas. Observe que el producto del paso ❾, AICAR, es el remanente del ATP liberado durante la biosíntesis de histidina (véase la Fig. 22-22, paso ❺). Se utilizan abreviaturas para la mayor parte de los intermediarios para simplificar la nomenclatura de los enzimas de la vía. El paso ❻a es la ruta alternativa de AIR a CAIR que se da en los eucariotas superiores.

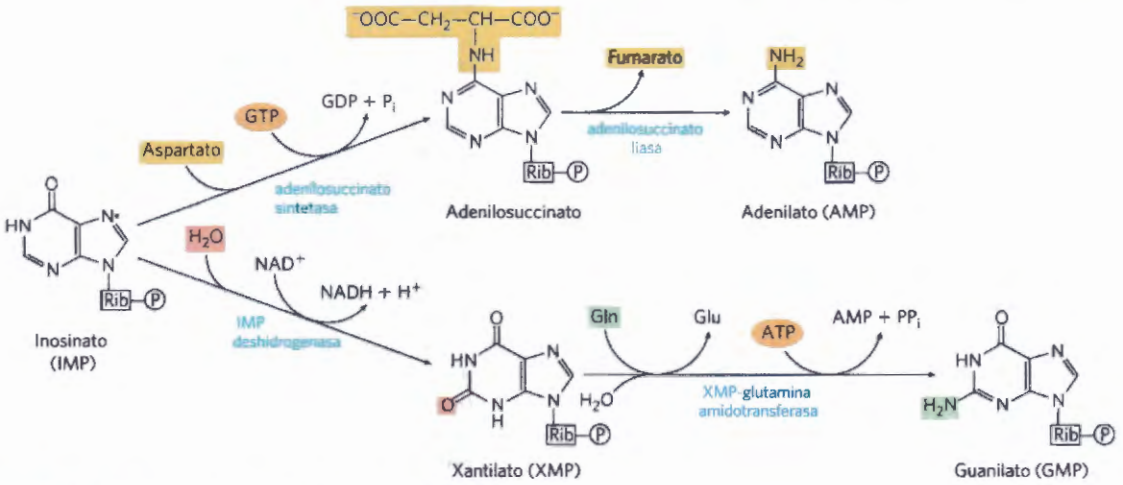


FIGURA 22-36 **Biosíntesis de AMP y GMP a partir de IMP.**

como fuente de fosfato de alta energía en la síntesis del adenilosuccinato. El guanilato se forma por oxidación del inosinato en C-2, que requiere NAD^+, seguida de la incorporación de un grupo amino procedente de la glutamina. El ATP se hidroliza a AMP y PP_i en el último paso (Fig. 22-36).

La biosíntesis de los nucleótidos de purina está regulada por retroinhibición

En la regulación de la velocidad global de síntesis de novo de los nucleótidos purínicos y de las velocidades relativas de formación de los dos productos finales, adenilato y guanilato cooperan tres mecanismos principales de retroalimentación **(Fig. 22-37)**. El primero de estos mecanismos se ejerce sobre la primera reacción específica de la síntesis de purinas: la transferencia de un grupo amino al PRPP para formar la 5-fosforribosilamina. Esta reacción está catalizada por el enzima alostérico glutamina-PRPP amidotransferasa, que es inhibido por los productos finales IMP, AMP y GMP. El AMP y el GMP actúan de manera sinérgica en esta inhibición concertada. Así pues, siempre que el AMP o el GMP se acumulan en exceso, se inhibe parcialmente el primer paso de su biosíntesis a partir de PRPP.

En el segundo mecanismo de control, que se ejerce más adelante, un exceso de GMP en la célula inhibe la formación de xantilato a partir de inosinato, catalizada por la IMP deshidrogenasa, sin afectar la formación de AMP. Por el contrario, una acumulación de adenilato inhibe la formación de adenilosuccinato por la adenilosuccinato sintetasa, sin que se vea afectada la biosíntesis de GMP. Cuando los dos productos se encuentran en concentraciones suficientes se acumula IMP que inhibe un paso anterior de la vía; esta estrategia reguladora se denomina **retroinhibición secuencial**. En el tercer mecanismo, el GTP es necesario para la conversión de IMP en AMP mientras que el ATP es necesario para la conversión de IMP en GMP (Fig. 22-36), un control recíproco que tiende a equilibrar la síntesis de los dos ribonucleótidos.

El mecanismo de control final es la inhibición de la síntesis de PRPP por regulación alostérica de la ribosa fosfato pirofosfoquinasa. Este enzima es inhibido por ADP y GDP y por los metabolitos de otras rutas en las que el PRPP es el punto de inicio.

Los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a partir de aspartato, PRPP y carbamil fosfato

Los ribonucleótidos comunes de pirimidina son la citidina 5' monofosfato (CMP; citidilato) y la uridina 5'-monofosfato (UMP; uridilato), que contienen las pirimidinas citosina y uracilo. La biosíntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina **(Fig. 22-38)** difiere en cierta medida de la síntesis de nucleótidos de purina, puesto que el anillo de seis átomos de la pirimidina se sintetiza primero y a continuación se une a la ribosa 5-fosfato. Este proceso necesita carbamil fosfato, también un interme-

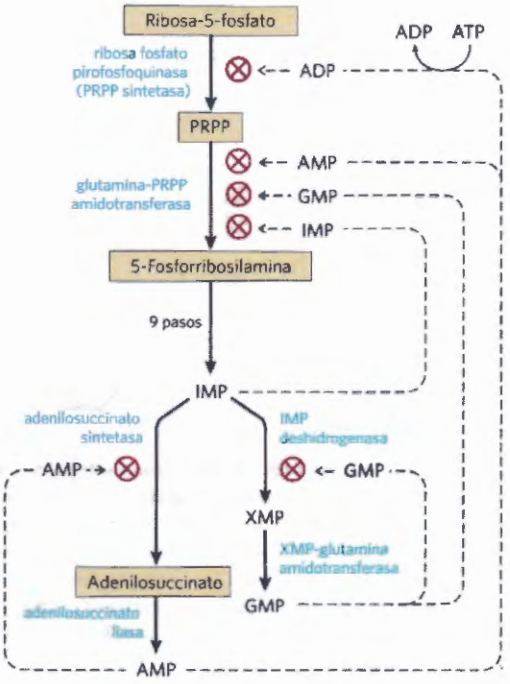


FIGURA 22-37 **Mecanismos de regulación de la biosíntesis de los nucleótidos de adenina y de guanina en *E. coli*.** La regulación de estas vías es distinta en otros organismos.

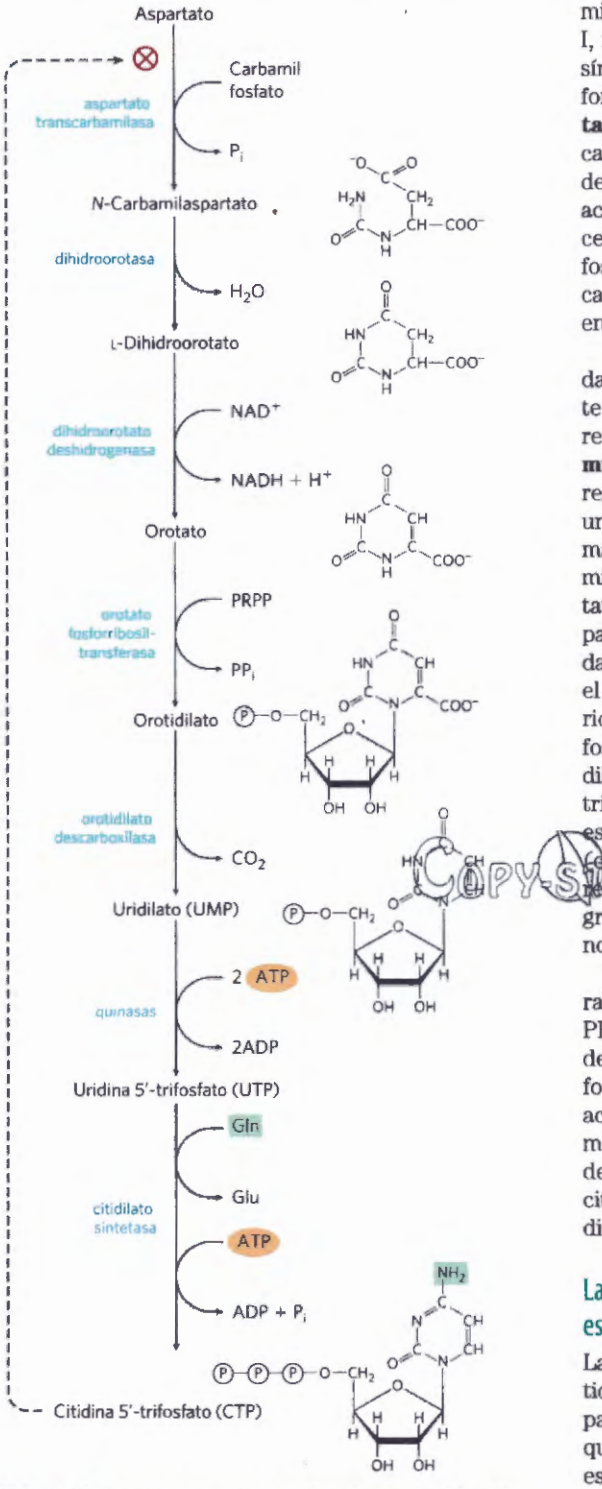


FIGURA 22-38 Síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina: biosíntesis de UTP y CTP por la vía del orotidilato. La pirimidina se construye a partir de carbamil fosfato y aspartato. A continuación la orotato fosforribosiltransferasa añade la ribosa 5-fosfato al anillo ya completo de pirimidina. El primer paso de la vía (no mostrado aquí; véase la Fig. 18-11a) es la síntesis de carbamil fosfato a partir de CO_2 y NH_4^+, catalizada en los eucariotas por la carbamil fosfato sintetasa II.

diario del ciclo de la urea. Sin embargo, tal como mencionó en el Capítulo 18, en los animales, el carbamil fosfato necesario para la síntesis de urea se forma en la mitocondria por acción de la carbamil fosfato sintetasa I, mientras que el carbamil fosfato necesario en la biosíntesis de pirimidinas se forma en el citosol por una forma distinta del enzima, la **carbamil fosfato sintetasa II**. En las bacterias, un único enzima suministra el carbamil fosfato necesario para la síntesis de arginina y de las pirimidinas. El enzima bacteriano tiene tres sitios activos separados, espaciados a lo largo de un canal de cerca de 100 Å de longitud **(Fig. 22-39)**. La carbamil fosfato sintetasa bacteriana es un buen ejemplo de canalización de intermediarios de reacción inestables entre sitios activos.

El carbamil fosfato reacciona con el aspartato para dar *N*-carbamilaspartato en el primer paso determinante de la síntesis de las pirimidinas (Fig. 22-38). Esta reacción está catalizada por la **aspartato transcarbamilasa.** En las bacterias este paso está estrictamente regulado, y la aspartato transcarbamilasa bacteriana es uno de los enzimas alostéricos más estudiados (véase más adelante). El anillo de pirimidina se cierra por eliminación de una molécula de agua del *N*-carbamilaspartato, en una reacción catalizada por la **dihidroorotasa**, para dar L-dihidroorotato. Este compuesto se oxida para dar el derivado pirimidínico orotato, reacción en la que el NAD^+ es el aceptor final de electrones. En los eucariotas, los tres primeros enzimas de esta vía (la carbamil fosfato sintetasa II, la aspartato transcarbamilasa y la dihidroorotasa) forman parte de una única proteína trifuncional. La proteína, conocida por las siglas CAD, está formada por tres cadenas polipeptídicas idénticas (cada una de M_r 230.000), con sitios activos para las tres reacciones en cada subunidad. Esto sugiere que los grandes complejos multienzimáticos pueden ser la norma en esta vía metabólica.

Una vez formado el orotato se añade la cadena lateral de ribosa 5-fosfato, aportada una vez más por el PRPP, para dar orotidilato (Fig. 22-38). El orotidilato se descarboxila a continuación para dar uridilato, que se fosforila a UTP. El CTP se forma a partir del UTP por acción de la **citidilato sintetasa,** a través de un intermediario acil fosfato (consumiendo un ATP). El dador de nitrógeno es normalmente la glutamina, aunque las citidilato sintetasas de muchas especies pueden utiliza directamente el NH_4^+.

La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina está regulada por retroinhibición

La regulación de la velocidad de síntesis de los nucleótidos de pirimidina en las bacterias depende en gran parte del enzima aspartato transcarbamilasa (ATCasa), que cataliza la primera reacción de la secuencia, y que es inhibido por CTP, el producto final de la secuencia (Fig. 22-38). La molécula de ATCasa bacteriana consta de seis subunidades catalíticas y seis subunidades reguladoras (véase la Fig. 6-34). Las moléculas de sustrato se unen a las subunidades catalíticas, mientras que el inhibidor alostérico CTP se une a las subunidades alostéricas. La molécula entera de ATCasa, así como sus subunidades, existen en dos conformaciones, una activa y otra inactiva. Cuando no hay CTP unido a las subunidades reguladoras la actividad enzimática es máxima. A medida que se acumula el CTP y se une a las subunidades reguladoras, éstas cambian de conformación. Este

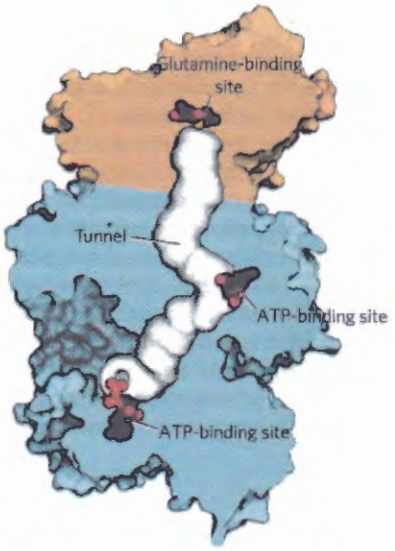


FIGURA 22-39 Canalización de intermedios en la carbamil fosfato sintetasa bacteriana. (De PDB ID 1M6V). La reacción catalizada por este enzima se ilustra en la Figura 18-11a. Las subunidades grandes y pequeñas se muestran en marrón y azul, respectivamente; el tunel entre sitios activos (de casi 100 Å de longitud) se muestra en blanco. En esta reacción una molécula de glutamina se une a la subunidad pequeña y cede su nitrógeno amídico en forma de NH_4^+, en una reacción del tipo de la glutamina amidotransferasa. El NH_4^+ entra en el tunel que lo conduce hasta un segundo sitio activo, donde se combina con bicarbonato en una reacción que requiere ATP. El carbamato a continuación vuelve a entrar en el tunel para alcanzar el tercer sitio activo, donde es fosforilado por el ATP a carbamil fosfato. Para resolver esta estructura el enzima se cristalizó con ornitina unida al sitio de unión del glutamato y ADP unido a los sitios de unión del ATP. [Fuente: Modificado de PDB ID 1M6 V.J.B. Thoden et al., *J.Biol. Chem.* 277: 39,722, 2002.]

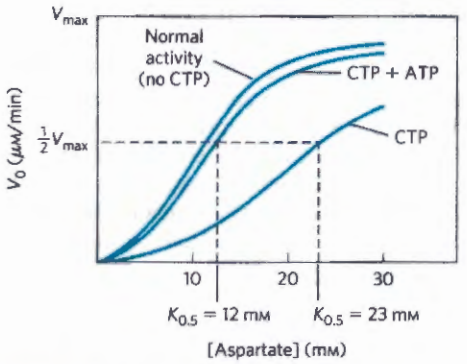


FIGURA 22-40 Regulación alostérica de la aspartato transcarbamilasa por CTP y ATP. La adición de 0,8 mM de CTP, el inhibidor alostérico de la ATCasa, aumenta la $K_{0.5}$ para el aspartato (curva inferior) reduciendo así la velocidad de conversión del aspartato en *N*-carbamilaspartato. El ATP a una concentración de 0,6 mM invierte completamente este efecto (curva central).

cambio se propaga a las subunidades catalíticas que, a su vez, adquieren una conformación inactiva. El ATP impide los cambios inducidos por el CTP. La **Figura 22-40** muestra los efectos de los reguladores alostéricos en la actividad de la ATCasa.

Los nucleósidos monofosfato se convierten en nucleósidos trifosfato

Los nucleótidos que se utilizarán en las biosíntesis se convierten generalmente en nucleósidos trifosfato. Las vías de conversión son comunes a todas las células. La fosforilación de AMP a ADP es promovida por la **adenilato quinasa**, según la reacción

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2\ ADP$$

El ADP así formado se fosforila a ATP por los enzimas glucolíticos o a través de la fosforilación oxidativa.

El ATP también es responsable de la formación de otros nucleósidos difosfato gracias a la acción de una clase de enzimas denominados **nucleósido monofosfato quinasas.** Estos enzimas, que, en general son específicos para una base concreta, pero no son específicos para el azúcar (ribosa o desoxirribosa), catalizan la reacción

$$ATP + NMP \rightleftharpoons ADP + NDP$$

Los eficientes sistemas celulares de refosforilación del ADP a ATP tienden a desplazar esta reacción en la dirección de los productos.

Los nucleósidos difosfato se convierten en trifosfatos por acción de un enzima ubicuo, la **nucleósido difosfato quinasa,** que cataliza la reacción

$$NTP_D + NDP_A \rightleftharpoons NDP_D + NTP_A$$

Este enzima tiene la característica destacable de no ser específico ni para la base (purinas o pirimidinas) ni para el azúcar (ribosa o desoxirribosa). Esta falta de especificidad se manifiesta tanto para el aceptor (A) como para el dador (D) de fosfato, si bien el dador (NTP_D) es casi siempre el ATP, pues está presente en concentraciones más elevadas que los demás nucleósidos trifosfato en condiciones aeróbicas.

Los ribonucleótidos son los precursores de los desoxirribonucleótidos

Los desoxirribonucleótidos, las unidades monoméricas del DNA, proceden de los ribonucleótidos correspondientes por reducción directa en el átomo de carbono 2' de la D-ribosa para formar el derivado 2'-desoxi. Por ejemplo, la adenosina difosfato (ADP) se reduce a 2'-desoxiadenosina difosfato (dADP) y el GDP se reduce a dGDP. Esta reacción es especial, pues la reducción tiene lugar en un carbono no activado; no se conoce ninguna reacción química análoga. La reacción está catalizada por la **ribonucleótido reductasa,** siendo la mejor caracterizada la de *E. coli*, cuyos sustratos son ribonucleósidos difosfato.

La reducción de la porción de D-ribosa de un ribonucleósido difosfato a 2'-desoxi-D-ribosa precisa un par de átomos de hidrógeno que, en último término, proporciona el NADPH a través de una proteína transportadora de hidrógenos, la **tiorredoxina**. Esta proteína ubicua realiza funciones redox similares en la fotosíntesis (véase la Fig. 20-46) y en otros procesos. Esta proteína posee parejas de grupos –SH que transportan átomos de hidrógeno desde el NADPH hasta el ribonucleósido difosfato. La forma oxidada (disulfuro) de la tiorredoxina se reduce con NADPH en una reacción catalizada por

la **tiorredoxina reductasa (Fig. 22-41)**; la tiorredoxina reducida es utilizada a continuación por la ribonucleótido reductasa para reducir los nucleósidos difosfato (NDP) a desoxirribonucleósidos difosfato (dNDP). Una segunda fuente de equivalentes de reducción para la ribonucleótido reductasa es el glutatión (GSH). El glutatión reduce una proteína estrechamente relacionada con la tiorredoxina, denominada **glutarredoxina**, la cual transfiere el poder reductor a la ribonucleótido reductasa (Fig. 22-41).

Hay que destacar que el mecanismo de reacción de la ribonucleótido reductasa es el ejemplo mejor caracterizado de la utilización de radicales libres en transformaciones bioquímicas, que antes se consideraba rara en los sistemas biológicos. El enzima presente en *E. coli* y en la mayor parte de eucariotas es un dímero $\alpha_2\beta_2$, con las subunidades catalíticas α_2 y las subunidades β_2 productoras de los radicales libres **(Fig. 22-42)**. Las subunidades catalíticas contienen dos tipos de sitios reguladores, tal como se describe más adelante. Los dos sitios activos del enzima están situados en la interfase entre las subunidades catalítica (α_2) y las generadoras de radicales libres (β_2). En cada sitio activo, una subunidad α aporta dos grupos tiol que son necesarios para la actividad, mientras que las subunidades β_2 aportan un radical tirosilo estable. Las subunidades β_2 también poseen un cofactor binuclear de hierro (Fe^{3+}) que ayuda a generar y estabilizar el radical Tyr^{122} (Fig. 22-42). El radical tirosilo se encuentra demasiado lejos del sitio activo para interaccionar directamente con el mismo, pero varios residuos aromáticos forman una ruta de transferencia de radicales de largo alcance hasta el sitio activo (Fig. 22-42c). Un mecanismo de reacción probable de la ribonucleótido reductasa se muestra en la **Figura 22-43**. En *E. coli*, las fuentes probables de los equivalentes de reducción necesarios para esta reacción son la tiorredoxina y la glutarredoxina, tal como se ha indicado anteriormente.

Se conocen tres clases de ribonucleótido reductasa. Sus mecanismos (cuando son conocidos) generalmente responden al esquema de la Figura 22-43, pero difieren en la identidad del grupo que suministra el radical del sitio activo y los cofactores necesarios para generarlo. El enzima de *E. coli* (clase I) requiere oxígeno para regenerar el radical tirosilo si está apantallado, y por lo tanto sólo funciona en condiciones aeróbicas. Los enzimas de la clase II, encontrados en otros microorganismos, tienen 5'-desoxiadenosilcobalamina (véase el Recuadro 17-2) en lugar de un centro binuclear de hie-

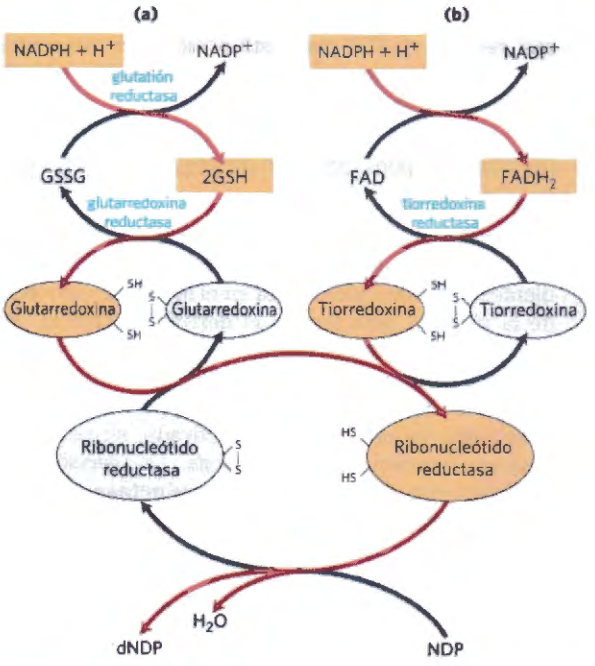


FIGURA 22-41 Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa. Los electrones se transfieren (flechas rojas) al enzima desde el NADPH a través de **(a)** la glutarredoxina o **(b)** la tiorredoxina. Los grupos sulfuro de la glutarredoxina reductasa son suministrados por dos moléculas de glutatión unido (GSH; GSSG indica glutatión oxidado). Observe que la tiorredoxina reductasa es un flavoenzima con FAD como grupo prostético.

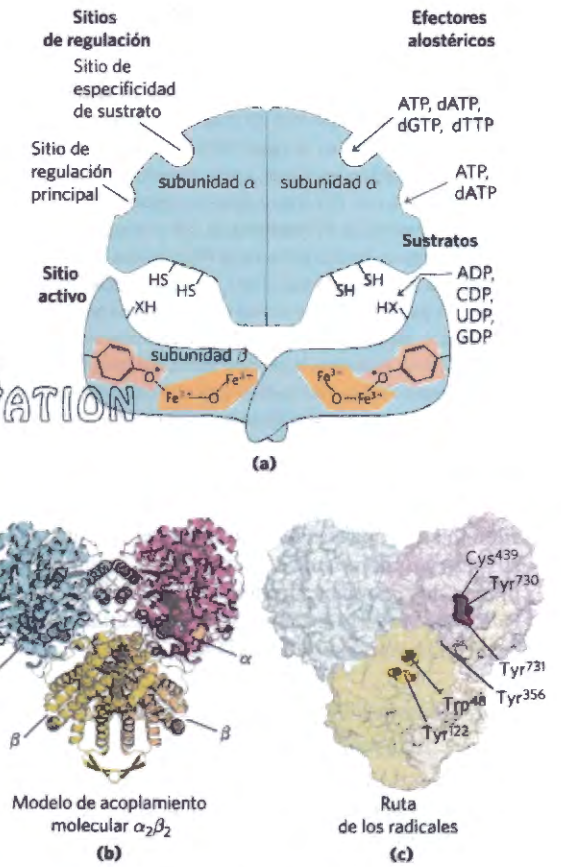
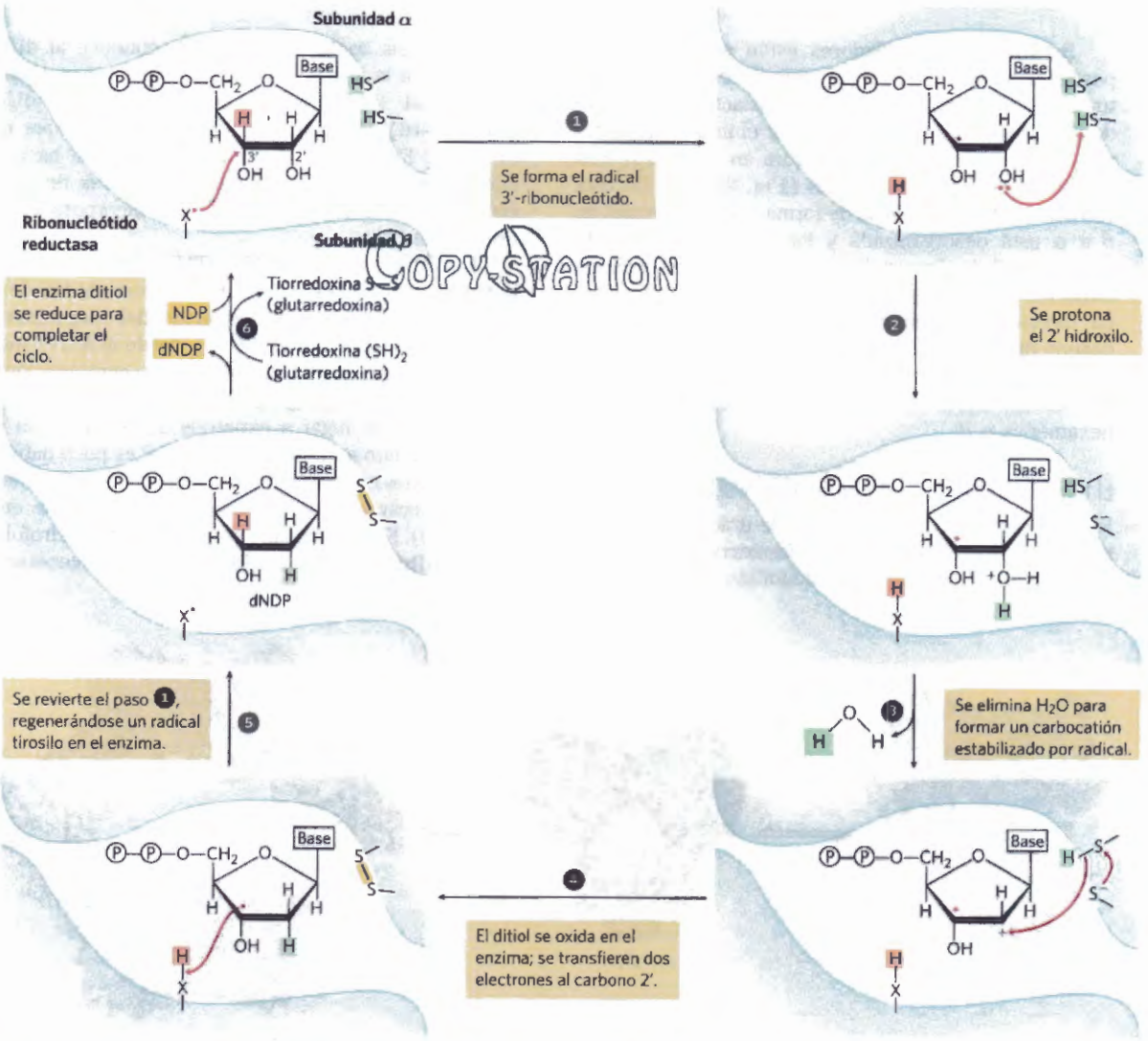


FIGURA 22-42 Ribonucleótido reductasa. (a) Esquema de la estructura en subunidades. La subunidad catalítica (α, también llamada R1) contiene los dos sitios reguladores descritos en la Fig. 22-44 y dos residuos Cys importantes en el mecanismo de reacción. Las subunidades β (también llamada R2) generadoras de radicales contienen el residuo crítico Tyr^{122} y el centro de hierro binuclear. **(b)** Las estructuras de α_2 y β_2 permiten deducir la estructura más probable de $\alpha_2\beta_2$ (de PDB ID 3UUS) **(c)** Ruta más probable de formación de radicales desde la Tyr^{122} inicial en una subunidad β hasta la Cys^{439} del sitio activo, que se usa en el mecanismo mostrado en la Figura 22-43. Varios residuos aminoácidos aromáticos participan en la transferencia de radicales a larga distancia, desde el punto de formación en la Tyr^{122} hasta el sitio activo donde esta unido el nucleótido sustrato. [Fuentes: **(a)** Información cedida por L. Thelander and P. Reichard, Annu Review Biochem. 48:133, 1979. (b, c). Derivado de PDB ID 3UUS, N. Ando et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:21,046, 2011.]

COPY-STATION

rro. Los enzimas de la clase III han evolucionado para funcionar en un medio anaeróbico. *E. coli* posee una ribonucleótido reductasa de la clase III diferente cuando crece en condiciones anaeróbicas; este enzima contiene un agrupamiento ferro-sulfurado (estructuralmente distinto del centro binuclear de hierro del enzima de clase I), requiere NADPH y *S*-adenosilmetionina para su actividad y utiliza nucleósidos trifosfato como sustratos en lugar de nucleósidos difosfato. La evolución de diferentes clases de ribonucleótido reductasas para la producción de los precursores del DNA en diferentes condiciones ambientales muestra la importancia de esta reacción en el metabolismo de los nucleótidos.

La regulación de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* no es habitual, pues no sólo su *actividad* sino también su *especificidad de sustrato* están reguladas por la unión de moléculas efectoras. Cada subunidad α posee dos tipos de sitio regulador (Fig. 22-42). Uno de los tipos influye en la actividad global del enzima y une ATP, que actúa como activador, o dATP, que actúa como inhibidor. El segundo tipo de sitio regulador modifica la especificidad por el sustrato en respuesta a la molécula efectora (ATP, dATP, dTTP o dGTP) que se haya unido **(Fig. 22-44)**. Cuando se une ATP o dATP se favorece la reducción del UDP y del CDP. Cuando se une dTTP o dGTP se estimula la reducción del GDP o del ADP, respectivamente. El esquema está diseñado para garantizar una reserva equilibrada de precursores para la síntesis de DNA. El ATP es también un activador general para la biosíntesis y para la reducción de los ribonucleótidos. La presencia de dATP en pequeñas cantidades incrementa la reducción de los nucleótidos de pirimidina. Una sobresuministro de dNTP de pirimidina se manifiesta por unos niveles elevados de dTTP, lo que provoca un cambio de especificidad que favorece la reducción de GDP. Los niveles elevados de dGTP, en cambio, favorecen la reducción del ADP, mientras que unos niveles altos de dATP inhiben el enzima. Se cree que estos efectores inducen varias conformaciones enzimáticas distintas con diferentes especificidades.



MECANISMO FIGURA 22-43 Mecanismo propuesto para la ribonucleótido reductasa. En el enzima de *E. coli* y de la mayoría de eucariotas, los grupos tiol activos se hallan en la subunidad α; el radical del sitio activo (-X•) se halla en la subunidad β y es, en *E. coli*, probablemente un radical mercaptilo de la Cys^{439} (véase la Fig. 22-42).

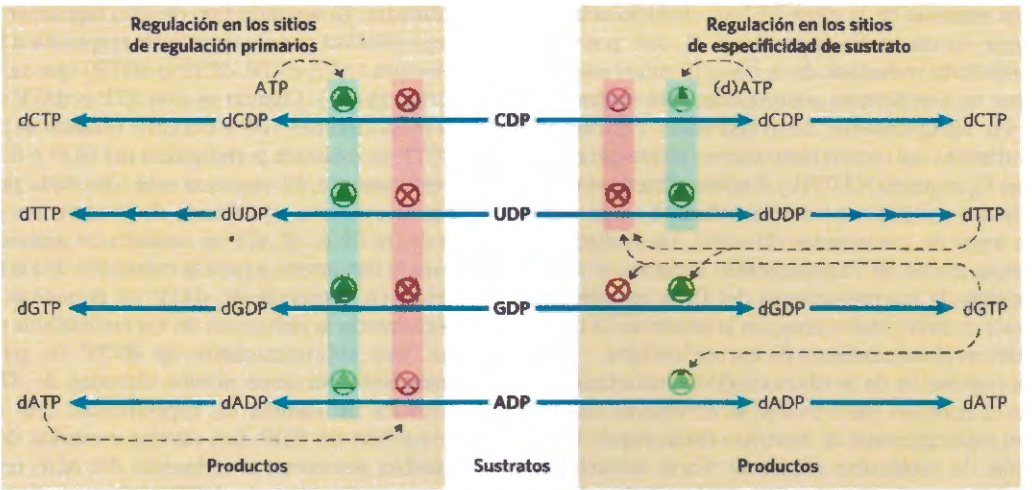


FIGURA 22-44 Regulación de la ribonucleótido reductasa por desoxinucleósidos trifosfato. La actividad global del enzima resulta afectada por la unión al sitio regulador principal (izquierda). La especificidad del enzima para el sustrato resulta afectada por la naturaleza de la molécula efectora que se une al segundo tipo de sitio regulador (derecha). El diagrama indica la inhibición o estimulación de la actividad enzimática por acción de los cuatro sustratos diferentes. La vía de dUDP a dTTP se describe más adelante (véanse las Figs. 22-46, 22-47).

Estos efectos reguladores están acompañados y posiblemente promovidos por grandes cambios estructurales en el enzima. Cuando la forma activa del enzima de *E. coli* ($\alpha_2\beta_2$) se inhibe al añadir el inhibidor alostérico dATP, se forma una estructura en anillo $\alpha_4\beta_4$ con subunidades α_2 y β_2 alternadas **(Fig. 22-45)**. En esta estructura alterada, la ruta de formación de radicales de β a α está desorganizada y los residuos de la ruta expuestos al disolvente, lo que evita la trasferencia de radicales con la consiguiente inhibición de la reacción. La formación de estructuras en anillo $\alpha_4\beta_4$ revierte cuando disminuyen los niveles de dATP. La ribonucleótido reductasa de levadura también oligomeriza en presencia de dATP, formando una estructura anular hexamérica $\alpha_6\beta_6$.

El timidilato se forma a partir de dCDP y dUMP

El DNA contiene timina en lugar de uracilo, y la vía de novo de la timina sólo incluye desoxirribonucleótidos. El precursor inmediato del timidilato (dTMP) es el dUMP. En las bacterias la vía que conduce al dUMP empieza por la formación de dUTP, ya sea por desaminación del dCTP o por fosforilación del dUDP **(Fig. 22-46)**. El dUTP se convierte en dUMP por una dUTPasa. Esta última reacción debe ser lo bastante eficiente como para mantener las reservas de dUTP suficientemente bajas y evitar así la incorporación de uridilato al DNA.

La conversión del dUMP a dTMP está catalizada por la **timidilato sintasa.** Se transfiere una unidad de un carbono con el nivel de oxidación del hidroximetilo (—CH_2OH) (véase la Fig. 18-17), desde el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato hasta el dUMP, y a continuación se reduce para dar un grupo metilo **(Fig. 22-47)**. La reducción tiene lugar a expensas de la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato, lo que es poco habitual en reacciones que utilizan el tetrahidrofolato. (Los detalles del mecanismo de esta reacción se muestran en la Fig. 22-53). El dihidrofolato se reduce a tetrahidrofolato por la **dihidrofolato reductasa,** una regeneración

Copy Station

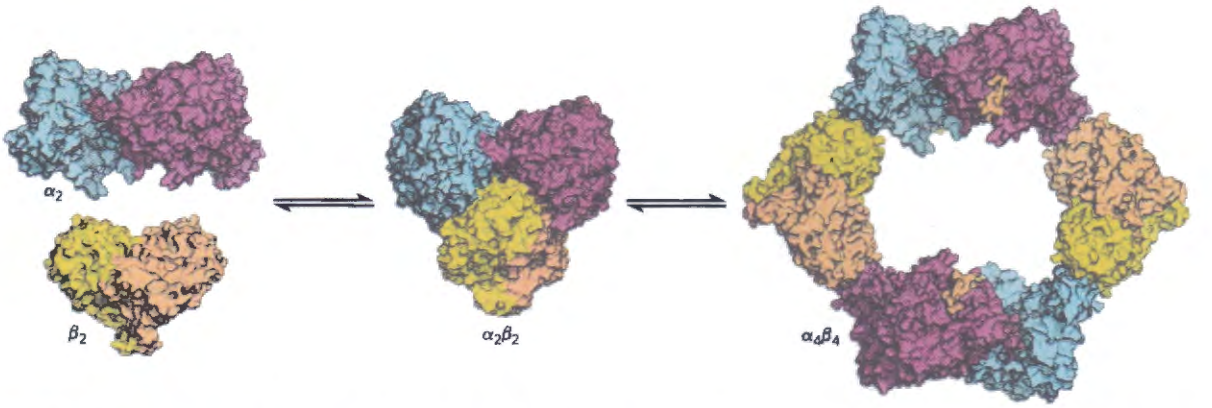


FIGURA 22-45 Oligomerización de la ribonucleótido reductasa inducida por el inhibidor alostérico dATP. A concentraciones elevadas de dATP (50 μM), $\alpha_4\beta_4$ forma estructuras anulares (PDB ID 3UUS). En esta conformación, los residuos en el trayecto de formación de los radicales están expuestos al disolvente, bloqueando la reacción de los radicales e inhibiendo el enzima. La oligomerización revierte a concentraciones de dATP más bajas. [Fuente: Derivado de PDB ID 3UUS, N. Ando et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:21,046, 2011.]

esencial por los muchos procesos que requieren tetrahidrofolato. En las plantas y en al menos un protista, las actividades timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa se hallan en una única proteína bifuncional.

Alrededor del 10% de la población humana (y hasta el 50% en las comunidades pobres) padece deficiencia de ácido fólico. Cuando la deficiencia es severa provoca enfermedades cardíacas, cáncer y algunos tipos de disfunción cerebral. Al menos una parte de los síntomas resulta de la disminución de la síntesis de timidilato, que provoca una incorporación anormal de uracilo en el DNA. El uracilo es reconocido por los sistemas de reparación del DNA (descritos en el Capítulo 25) del que es eliminado. La presencia de elevados niveles de uracilo en el DNA origina cortes en las cadenas del DNA que pueden afectar gravemente la función y la regulación del DNA nuclear, para provocar finalmente los efectos descritos en el corazón y el cerebro, así como un aumento de la mutagénesis que favorece el cáncer. ■

La degradación de las purinas y pirimidinas produce ácido úrico y urea, respectivamente

Los nucleótidos purínicos se degradan por una vía en la que el grupo fosfato se pierde por acción de la **5'-nucleotidasa (Fig. 22-48).** El adenilato se transforma en adenosina, que se desamina a inosina por la **adenosina desaminasa** y, a su vez, la inosina se hidroliza a hipoxantina (su base púrica) y D-ribosa. La hipoxantina se oxida sucesivamente a xantina y a ácido úrico por la **xantina oxidasa**, un flavoenzima con un átomo de molibdeno y cuatro centros ferro-sulfurados en su grupo prostético. El oxígeno molecular es el aceptor de electrones en esta compleja reacción.

El catabolismo del GMP también proporciona ácido úrico como producto final. El GMP se hidroliza primero para dar guanosina, que a continuación se descompone dando guanina libre. La hidrólisis del grupo amino de la guanina la convierte en xantina, que a su vez se transforma en ácido úrico por la xantina oxidasa (Fig. 22-48).

El ácido úrico es el producto final de excreción del catabolismo de las purinas en los primates, aves y algunos otros animales. Un ser humano adulto sano excreta ácido úrico a un ritmo de unos 0,6 g/24 h; el producto excretado procede en parte de las purinas ingeridas y en parte del recambio de nucleótidos purínicos de los ácidos nucleicos. En la mayoría de mamíferos y en

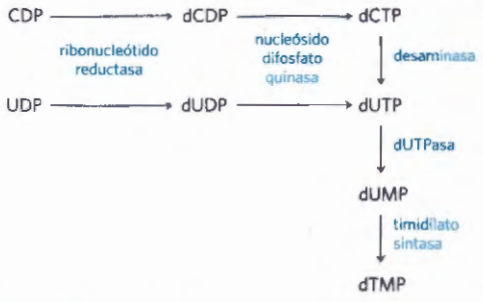


FIGURA 22-46 Biosíntesis del timidilato (dTMP). Las rutas se muestran empezando con la reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. En la Figura 22-47 se dan detalles de la reacción de la timidilato sintasa.

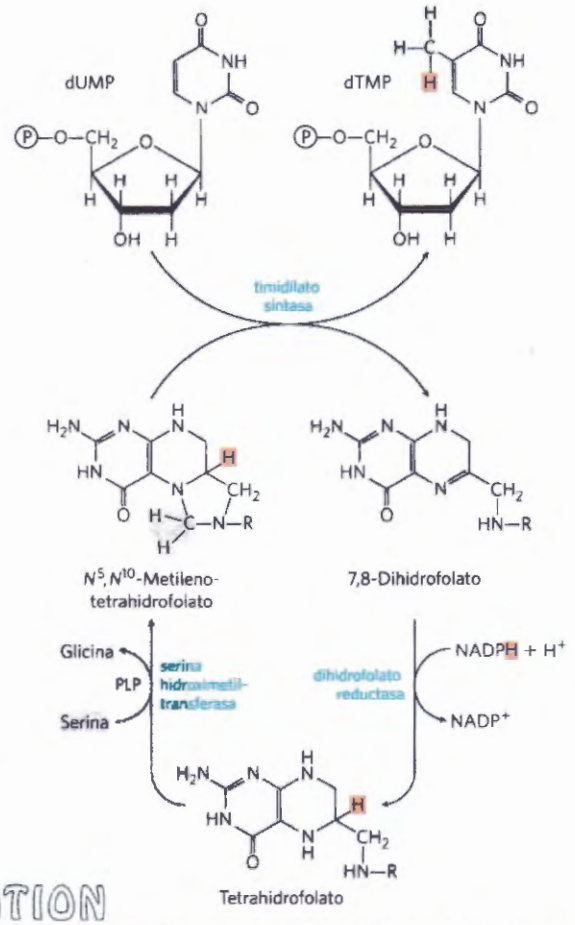


FIGURA 22-47 Conversión de dUMP en dTMP por la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa. La serina hidroximetiltransferasa es necesaria para la regeneración de la forma N^5,N^{10}-metileno del tetrahidrofolato. En la síntesis de dTMP los tres hidrógenos del grupo metilo incorporado proceden del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato (rosa y gris).

muchos otros vertebrados el ácido úrico se degrada posteriormente a **alantoína**, por acción de la **urato oxidasa**. En otros organismos la vía se prolonga todavía más, como se muestra en la Figura 22-48.

Las vías para la degradación de las pirimidinas generalmente producen NH_4^+ y, por tanto, también estimulan la síntesis de urea. La timina, por ejemplo, se degrada a metilmalonilsemialdehído **(Fig. 22-49)**, un intermediario del catabolismo de la valina. Este compuesto se degrada posteriormente hasta succinil-CoA a través de propionil-CoA y metilmalonil-CoA (véase la Fig. 18-27).

Se han descrito anomalías genéticas en el metabolismo humano de las purinas, algunas con graves consecuencias. Por ejemplo, la **deficiencia de adenosina desaminasa (ADA)** provoca una inmunodeficiencia grave, en la que los linfocitos T y los linfocitos B no se desarrollan correctamente. La falta de ADA conduce a un aumento de unas 100 veces en la concentración celular de dATP, un potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa (Fig. 22-44). Niveles elevados de dATP provocan un déficit general de los otros dNTP en los linfocitos T. Las bases de la toxicidad en los linfocitos B son menos claras. Los individuos con deficiencia de ADA carecen de un sistema inmunitario eficaz y no

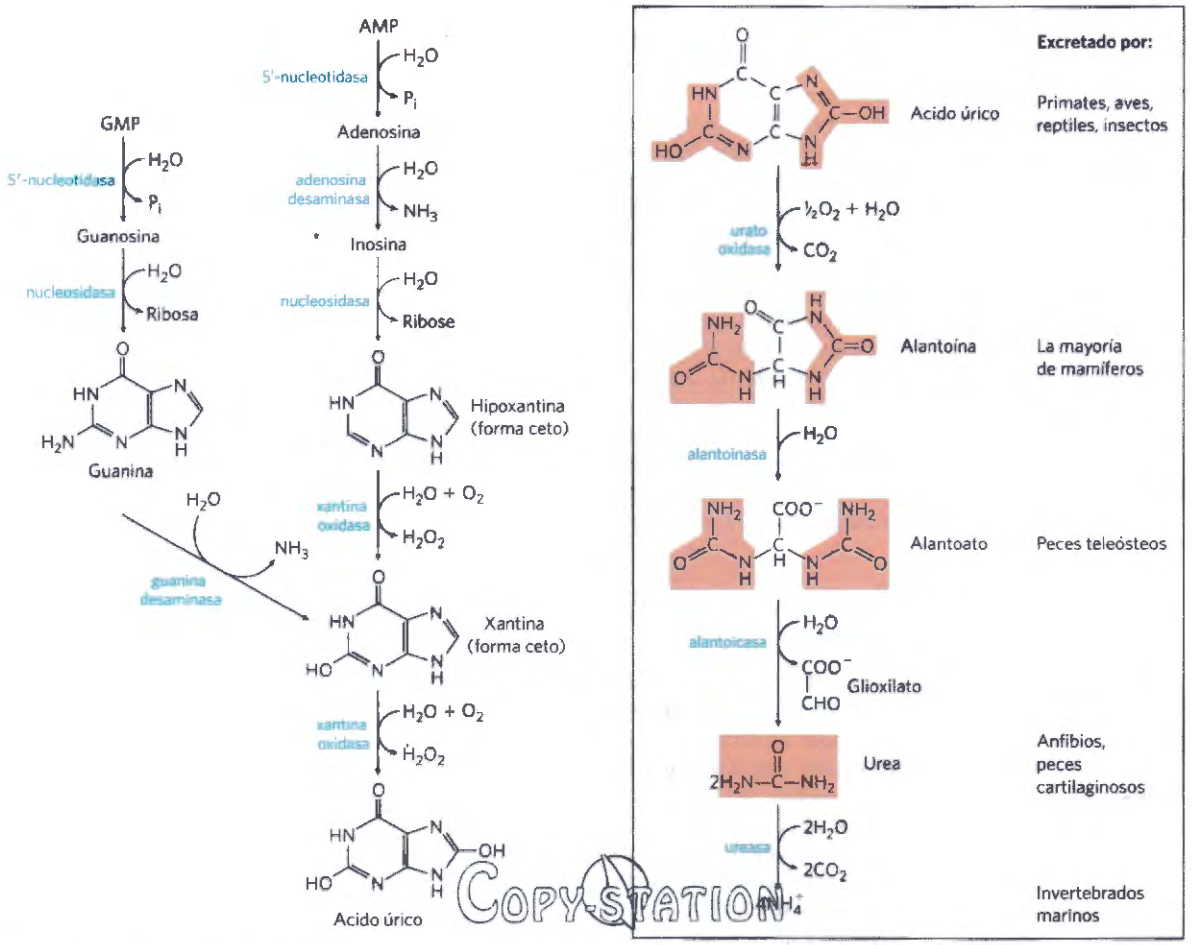


FIGURA 22-48 Catabolismo de los nucleótidos purínicos. Observe que los primates excretan mucho más nitrógeno como urea, a través del ciclo de la urea (Capítulo 18), que como ácido úrico procedente de la degradación de las purinas. De igual manera, los peces excretan mucho más nitrógeno en forma de NH_4^+ que de urea, producida por la vía que aquí se muestra.

pueden sobrevivir a menos que se mantengan aislados en un ambiente, o "burbuja", estéril. La deficiencia de ADA fue uno de los primeros objetivos de los ensayos de terapia génica en humanos (en 1990), que obtuvo resultados irregulares. En pruebas más recientes, algunos individuos con deficiencia de ADA recuperaron la función inmune normal al suministrárseles un gen ADA funcional. ■

Las bases púricas y pirimidínicas se reciclan a través de vías de recuperación

En la degradación metabólica celular de los nucleótidos se forman constantemente bases púricas y pirimidínicas libres. Las purinas libres se recuperan en gran parte y vuelven a ser utilizadas para sintetizar nucleótidos, en una vía mucho más sencilla que la síntesis de novo de los nucleótidos de purina descrita anteriormente. Una de las vías principales de recuperación consiste en una única reacción catalizada por la **adenosina fosforribosiltransferasa**, en la que la adenina libre reacciona con PRPP para dar el correspondiente nucleótido de adenina:

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$

La guanina y la hipoxantina (el producto de la desaminación de la adenina; Fig. 22-48) libres se recuperan de la misma forma por la **hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa.** En los microorganismos, y posiblemente en los mamíferos, existe una vía parecida para la recuperación de las bases pirimidínicas.

La carencia genética de actividad hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa se ha descrito tan sólo en niños varones y se manifiesta con una serie de síntomas peculiares que se conocen como **síndrome de Lesch-Nyhan.** Los niños afectados por esta enfermedad genética, que empieza a manifestarse alrededor de los 2 años de edad, padecen retraso mental y mala coordinación. Son, además, tremendamente hostiles y muestran tendencias compulsivas autodestructivas: se automutilan mordiéndose los labios y los dedos de manos y pies.

Los efectos devastadores del síndrome de Lesch-Nyhan son ilustrativos de la importancia de las vías de recuperación. La hipoxantina y la guanina se forman continuamente como productos de degradación de los ácidos nucleicos. En ausencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, aumentan los niveles de PRPP, lo que conduce a una sobreproducción de purinas por la vía de novo, lo que a su vez repercute en niveles eleva-

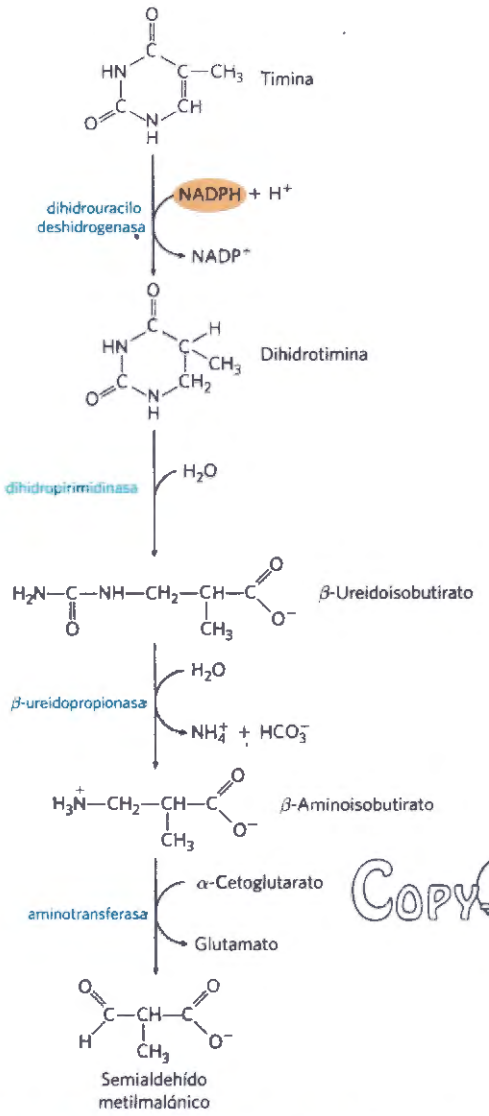


FIGURA 22-49 Catabolismo de una pirimidina. Se muestra la vía de degradación de la timina. El metilmalonilsemialdehído continúa degradándose hasta succinil-CoA.

dos de ácido úrico y a lesiones tisulares parecidas a las que tienen lugar en la gota (véase más adelante). El cerebro depende especialmente de las vías de recuperación, hecho que puede estar relacionado con los trastornos en el sistema nervioso central que se manifiestan en los niños con síndrome de Lesch-Nyhan. Este síndrome es otro de los objetivos potenciales de terapia génica. ■

La causa de la gota es una sobreproducción de ácido úrico

La gota (erróneamente) relacionada durante mucho tiempo con la "buena vida", es una enfermedad de las articulaciones debida a una concentración elevada de ácido úrico en la sangre y en los tejidos. Las articulaciones se inflaman, producen dolor y desarrollan artritis a causa de una deposición anormal de cristales de urato sódico. Los riñones también resultan afectados, porque el exceso de ácido úrico se deposita en los túbulos renales. La gota afecta principalmente a los individuos de sexo masculino. La causa precisa de la

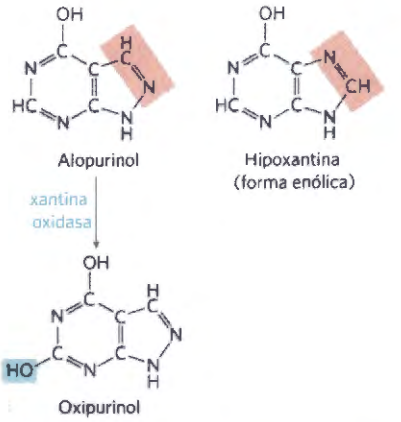


FIGURA 22-50 El alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa. La hipoxantina es el sustrato normal de la xantina oxidasa. Sólo una pequeña modificación en la estructura de la hipoxantina (sombreada en rosa) produce el inhibidor enzimático alopurinol que tiene efectos terapéuticos. En el sitio activo el alopurinol se convierte en oxipurinol, un potente inhibidor competitivo que permanece unido fuertemente a la forma reducida del enzima.

gota es desconocida, pero a menudo implica una subexcreción de urato. En algunos casos podría existir una deficiencia genética de algún enzima del metabolismo de las purinas.

La gota se trata eficazmente mediante de una combinación de terapia nutricional y farmacológica. Deben suprimirse de la dieta los alimentos especialmente ricos en nucleótidos y ácidos nucleicos, tales como el hígado o los productos glandulares. Se consigue una mejoría importante de los síntomas con el fármaco **alopurinol (Fig. 22-50)**, un inhibidor de la xantina oxidasa, el enzima que cataliza la transformación de las purinas en ácido úrico. El alopurinol es un sustrato de la xantina oxidasa, que convierte el alopurinol en oxipurinol (aloxantina). El oxipurinol inactiva la forma reducida del enzima al permanecer fuertemente unido al sitio activo. Cuando la xantina oxidasa está inhibida, los productos de excreción del metabolismo de las purinas son la xantina y la hipoxantina, que son más hidrosolubles que el ácido úrico y tienen menor probabilidad de for-

COPY-STATION



George Hitchings, 1905-1998, and Gertrude Elion, 1918-1999. [Fuente: Will and Deni Mcintyre/Science Source/Getty Images.]

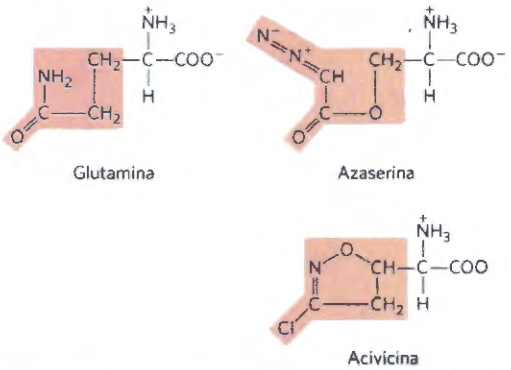


FIGURA 22-51 Azaserina y acivicina, inhibidores de las glutamina amidotransferasas. Estos análogos de la glutamina interfieren en toda una serie de vías biosintéticas de aminoácidos y nucleótidos.

mar depósitos cristalinos. El alopurinol fue desarrollado por Gertrude Elion y George Hitchings, quienes también desarrollaron el aciclovir, utilizado para el tratamiento del herpes, y otros análogos de purinas utilizados en la quimioterapia contra el cáncer. ■

Muchos agentes quimioterápicos actúan sobre enzimas de las rutas de biosíntesis de nucleótidos

El crecimiento de las células cancerosas no está controlado de la misma manera que el crecimiento celular en la mayoría de tejidos normales. Las células cancerosas tienen requerimientos mayores de nucleótidos como precursores de la síntesis de DNA y RNA y, en consecuencia, suelen ser más sensibles que las células normales a inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos. Toda una serie, que va en aumento, de agentes quimioterápicos, contra el cáncer y otras enfermedades, actúan por inhibición de uno o más enzimas de estas vías. Examinaremos aquí algunos ejemplos bien estudiados que ilustran enfoques productivos y que ayudan a comprender cómo funcionan estos enzimas.

La primera serie de agentes consiste en compuestos que inhiben las glutamina amidotransferasas. Recuerde que la glutamina es un dador de nitrógeno en al menos media docena de reacciones distintas de la biosíntesis de nucleótidos. Los sitios de unión de la glutamina y los mecanismos mediante los que se extrae el NH_4^+ son bastante parecidos en muchos de estos enzimas. La mayoría se inhiben fuertemente por análogos de la glutamina tales como la **azaserina** y la **acivicina (Fig. 22-51)**. La azaserina, caracterizada por John Buchanan en la década de 1950, fue uno de los primeros ejemplos de inactivador que actuaba a través de un mecanismo enzimático (inhibidor suicida; ver p. 210 y Recuadro 6-3). La acivicina promete ser un buen agente quimioterápico anticancerígeno.

Otras dianas útiles para agentes farmacológicos son los enzimas timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa. Estos enzimas proporcionan la única vía celular para la síntesis de timina **(Fig. 22-52)**. Un inhibidor que actúa sobre la timidilato sintasa, el **fluorouracilo**, es un importante agente quimioterápico. El fluorouracilo no es en sí mismo el inhibidor enzimático. En la célula, las vías de recuperación lo convierten en el desoxinucleósido monofosfato, FdUMP, que se une al enzima inactivándolo. La inhibición por FdUMP **(Fig. 22-53)** es un ejemplo clásico de inactivación basada en un mecanismo enzimático. Otro agente quimioterápico importante, el **metotrexato**, es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Este análogo del folato actúa como inhibidor competitivo; el metotrexato se une al enzima con una afinidad unas 100 veces mayor que el dihidrofolato. La **aminopterina** es un compuesto relacionado que actúa de forma similar.

El potencial terapéutico de los inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos no se limita al tratamiento del

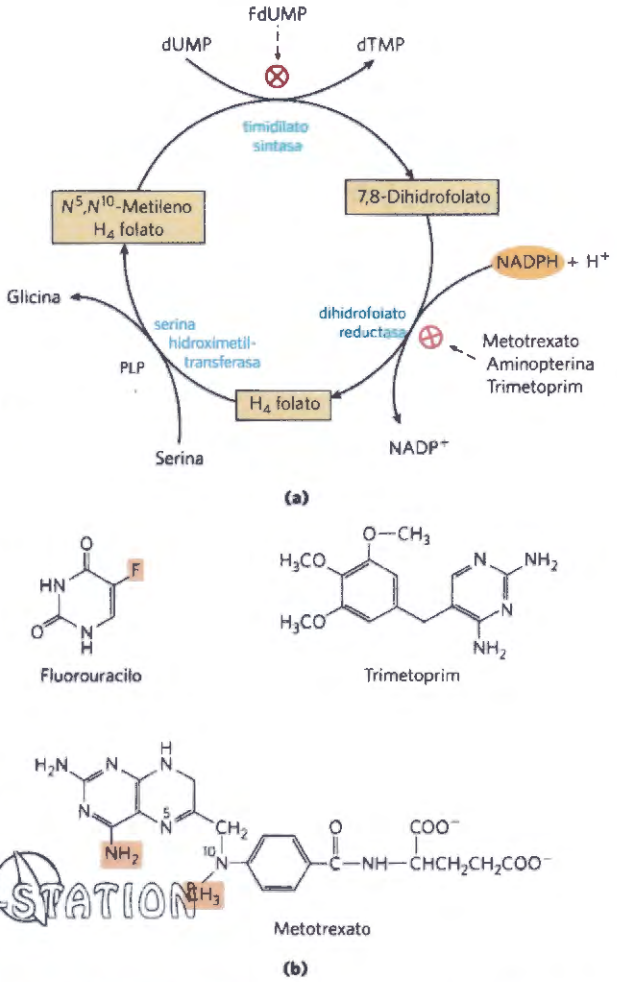
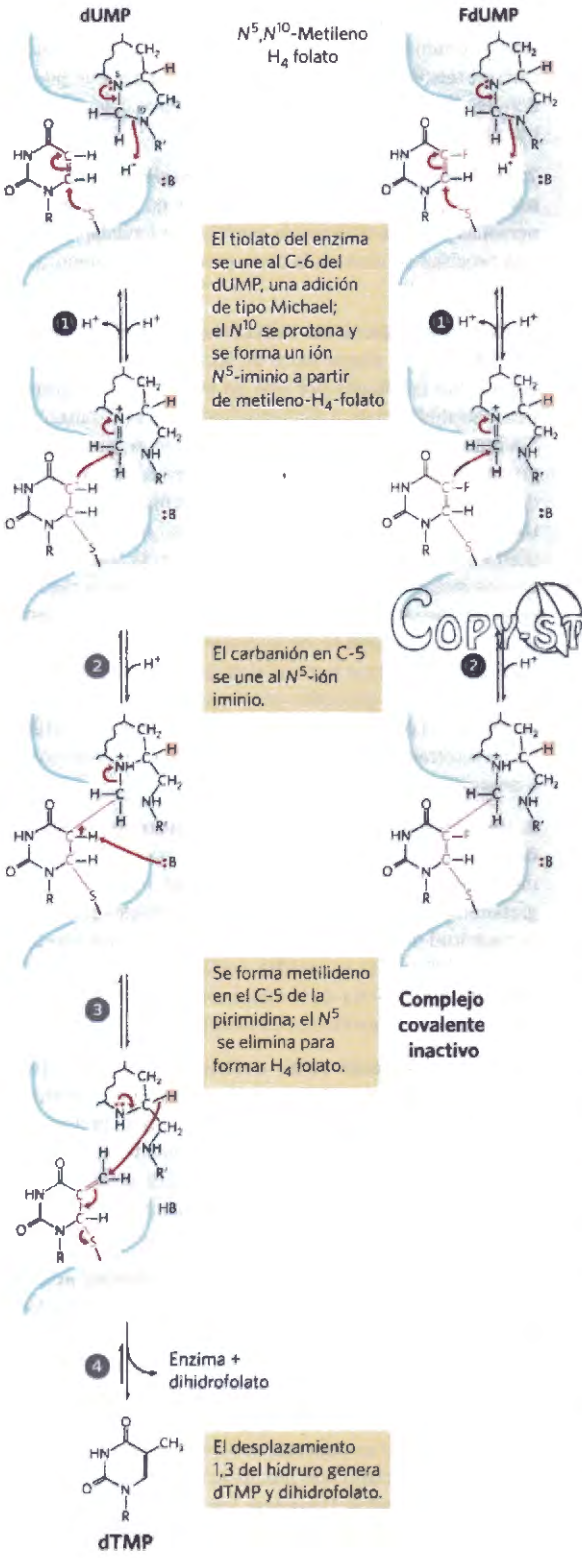


FIGURA 22-52 Síntesis del timidilato y metabolismo del folato como objetivos quimioterápicos. (a) Durante la síntesis del timidilato, el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato se convierte en 7,8-dihidrofolato; el N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato se regenera en dos pasos (véase la Fig. 22-47). Este ciclo es una de las principales dianas de varios agentes quimioterápicos. **(b)** El fluorouracilo y el metotrexato son importantes agentes en quimioterapia. En las células el fluorouracilo se convierte en FdUMP, que inhibe la timidilato sintasa. El metotrexato es un análogo estructural del tetrahidrofolato, que inhibe la dihidrofolato reductasa; los grupos amino y metilo sombreados sustituyen, respectivamente, a un oxígeno carbonílico y a un protón en el folato (véase la Fig. 22-47). Otro análogo importante del folato, la aminopterina, es idéntico al metotrexato, exceptuando que carece del grupo metilo sombreado. El trimetoprim, un inhibidor de alta afinidad de la dihidrofolato reductasa bacteriana se desarrolló como antibiótico.

MECANISMO FIGURA 22-53 Conversión del dUMP en dTMP y su inhibición por FdUMP. La parte izquierda se representa el mecanismo de reacción normal de la timidilato sintasa. El grupo sulfhidrilo nucleofílico aportado por el enzima en el paso ❶ y los átomos del anillo de dUMP que participan en la reacción se muestran en rojo; :B indica una cadena lateral de un aminoácido que actúa como base para capturar un protón después del paso ❸. Los hidrógenos procedentes del grupo metileno del N^5,N^{10}-metilenotetrahidrofolato están sombreados en gris. El desplazamiento 1,3 de un hidruro (paso ❹), desplaza un ión hidruro (sombreado en rosa) desde el C-6 del H_4 folato hasta el grupo metilo de la timidina, provocando la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato. Este desplazamiento de un hidruro está bloqueado cuando el sustrato es FdUMP (derecha). Los pasos ❶ y ❷ de la reacción transcurren normalmente, pero se forma un complejo estable con el FdUMP, unido covalentemente al enzima y al tetrahidrofolato, que inactiva el enzima.



cáncer. Todas las células de crecimiento rápido (incluidas bacterias y protistas) son objetivos potenciales. El **trimetoprim,** un antibiótico desarrollado por Hitchings y Elion, se une a la dihidrofolato reductasa bacteriana una 100.000 veces más fuertemente que al enzima de mamíferos. Se utiliza para tratar ciertas infecciones bacterianas de las vías urinarias y del oído medio. Algunos protistas parásitos, tales como los tripanosomas que causan la enfermedad del sueño en África (tripanosomiasis africana), carecen de vías para la biosíntesis de novo de nucleótidos por lo que son muy sensibles a agentes que interfieran con sus vías de captación de nucleótidos del entorno usando vías de recuperación. El alopurinol (Fig. 22-50) y una serie de análogos de las purinas representan una esperanza para el tratamiento de la tripanosomiasis africana y de enfermedades relacionadas. Véase el Recuadro 6-3 para una aproximación distinta del tratamiento de la tripanosomiasis africana, hecha posible gracias a los avances de los conocimientos sobre el metabolismo y los mecanismos de acción de los enzimas. ■

COPY-STATION

RESUMEN 22.4 Biosíntesis y degradación de los nucleótidos

- El sistema anular purínico se construye paso a paso empezando con la 5-fosforribosilamina. Los aminoácidos glutamina, glicina y aspartato aportan todos los átomos de nitrógeno de las purinas. Dos pasos de ciclación forman el núcleo de la purina.
- Las pirimidinas se sintetizan a partir de carbamil fosfato y aspartato. A continuación se añade ribosa 5-fosfato para dar ribonucleótidos de pirimidina.
- Los nucleósidos monofosfato se convierten en sus trifosfatos correspondientes mediante reacciones de fosforilación enzimáticas. Los ribonucleótidos se convierten en desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa, un enzima con características mecanísticas y reguladoras hasta ahora no descritas. Los nucleótidos de timina proceden del dCMP y dUMP.
- El ácido úrico y la urea son los productos finales de la degradación de purinas y pirimidinas.
- Las purinas libres se pueden recuperar y volver a integrar en nucleótidos. Defectos genéticos en ciertos enzimas de recuperación son la causa de enfermedades graves tales como el síndrome de Lesch-Nyhan y la deficiencia de ADA.
- La acumulación de cristales de ácido úrico en las articulaciones, debida probablemente a otro defecto genético, da lugar a la gota.
- Los enzimas de las rutas biosintéticas de nucleótidos son la diana de toda una serie de agentes quimioterápicos utilizados en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

ciclo del nitrógeno 852
fijación
del nitrógeno 852
anamox 852
simbiontes 855
complejo
de la nitrogenasa 855
agregado P 855
cofactor FeMo 855
leghemoglobina 859
glutamina sintetasa 860
glutamato sintasa 861
glutamina
amidotransferasas 862
triptófano sintasa 871
porfirina 875
porfiria 876
bilirrubina 876
fosfocreatina 878
creatina 878
glutatión (GSH) 878
auxina 880
dopamina 880
noradrenalina 880
adrenalina 880
γ-aminobutirato
(GABA) 880
serotonina 880
histamina 880
cimetidina 880
espermina 880
espermidina 880
ornitina descarboxilasa 880
ruta de novo 882
ruta de
recuperación 882
inosinato (IMP) 883
carbamil fosfato
sintetasa II 886
aspartato
transcarbamilasa 886
nucleósido monofosfato
quinasa 887
nucleósido difosfato
quinasa 887
ribonucleótido
reductasa 887
tiorredoxina 887
timidilato sintasa 890
dihidrofolato reductasa 890
deficiencia de adenosina
desaminasa (ADA) 891
síndrome
de Lesch-Nyhan 892
alopurinol 893
azaserina 894
acivicina 894
fluorouracilo 894
metotrexato 894
aminopterina 894

Problemas

1. Consumo de ATP por los nódulos de las raíces de plantas leguminosas Las bacterias que residen en los nódulos de las raíces de la planta del guisante consumen más del 20% del ATP que produce la planta. Sugiera alguna razón para que estas bacterias consuman tanto ATP.

2. Glutamato deshidrogenasa y síntesis proteica La bacteria *Methylophilus methylotrophus* puede sintetizar proteína a partir de metanol y amoníaco. La introducción, mediante técnicas de DNA recombinante, del gen de la glutamato deshidrogenasa de *E. coli* en *M. Methylotrophus* mejora el rendimiento de proteína. ¿Por qué esta manipulación genética mejora el rendimiento de proteína?

3. Mecanismos de reacción con participación del PLP El piridoxal fosfato puede catalizar transformaciones a uno o dos carbonos del carbono α de un aminoácido. El enzima treonina sintasa (véase la Fig. 22-17) cataliza la conversión dependiente de PLP de la fosfohomoserina en treonina. Sugiera un mecanismo para esta reacción.

4. Transformación del aspartato en aspargina Hay dos rutas para transformar el aspartato en asparagina a expensas de ATP. Muchas bacterias tienen una asparagina sintetasa que usa el ión amonio como fuente de nitrógeno. Los mamíferos tienen una asparagina sintetasa que usa glutamina como fuente de nitrógeno. ¿Dado que esta última requiere un ATP extra (para la síntesis de glutamina), por qué los mamíferos usan esta ruta?

5. Ecuación de la síntesis de aspartato a partir de glucosa Escriba la ecuación neta para la síntesis de aspartato (un aminoácido no esencial) a partir de glucosa, dióxido de carbono y amoníaco.

6. Inhibidores de la asparagina sintetasa en la terapia de la leucemia La asparagina sintetasa de mamíferos es una amidotransferasa dependiente de glutamina. Los esfuerzos para identificar un inhibidor efectivo de la asparagina sintetasa humana para su uso en quimioterapia para pacientes con leucemia no se han centrado en el dominio amino-terminal con actividad glutaminasa, sino en el dominio carboxi-terminal con actividad sintetasa. Explique por qué el dominio de la glutaminasa no es un objetivo prometedor en la búsqueda de un fármaco eficaz.

7. Deficiencia de fenilalanina hidroxilasa y dieta La tirosina es normalmente un aminoácido no esencial, pero las personas con una deficiencia genética de fenilalanina hidroxilasa precisan tirosina en la dieta para un crecimiento normal. Explíquelo.

8. Cofactores para las reacciones de transferencia de un carbono La mayor parte de las transferencias de un carbono están facilitadas por uno de estos tres cofactores: biotina, tetrahidrofolato o *S*-adenosilmetionina (Capítulo 18). La *S*-adenosilmetionina se utiliza generalmente como dador de grupos metilo; el potencial de transferencia de grupos metilo del N^5-metiltetrahidrofolato resulta insuficiente para la mayoría de reacciones biosintéticas. Sin embargo, un ejemplo de la utilización de N^5-metiltetrahidrofolato en la transferencia de grupos metilo es la formación de metionina por la reacción de la metionina sintasa (paso ❻ de la Fig. 22-17); la metionina es el precursor inmediato de la *S*-adenosilmetionina (véase la Fig. 18-18). Explique por qué el grupo metilo de la *S*-adenosilmetionina puede proceder del N^5-metiltetrahidrofolato, a pesar de que el potencial de transferencia del grupo metilo en el N^5-metiltetrahidrofolato es unas 10^3 veces menor que en la *S*-adenosilmetionina.

9. Regulación concertada en la biosíntesis de aminoácidos La glutamina sintetasa de *E. coli* es modulada independientemente por varios productos del metabolismo de la glutamina (véase la Fig. 22-8). En esta inhibición concertada, la magnitud de la inhibición enzimática es mayor que la suma de las inhibiciones separadas causadas por cada producto. ¿Cuál sería la ventaja de la inhibición concertada para *E. coli* creciendo en un medio rico en histidina?

10. Relación entre deficiencia de ácido fólico y anemia La deficiencia de ácido fólico, considerada la deficiencia vitamínica más común, es causa de un tipo de anemia en la que disminuye la síntesis de hemoglobina y los eritrocitos no maduran adecuadamente. ¿Cuál es la relación metabólica entre la síntesis de hemoglobina y la deficiencia de ácido fólico?

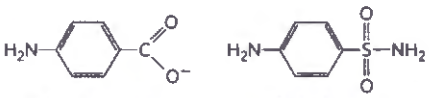
11. Biosíntesis de nucleótidos en bacterias auxotróficas para aminoácidos Las células de *E. coli* normales pueden sintetizar los 20 aminoácidos estándar, pero algunos mutantes, llamados auxótrofos para los aminoácidos, son incapaces de sintetizar un aminoácido específico y necesitan que éste sea añadido al medio de cultivo para un crecimiento óptimo. Además de su papel en la síntesis de proteínas, algunos aminoácidos también son precursores de otros productos celulares nitrogenados. Considere los tres auxótrofos para aminoácidos incapaces de sintetizar glicina, glutamina y aspartato,

Copy-Sterion

respectivamente. Para cada mutante, ¿qué productos nitrogenados, además de las proteínas, no podrían ser sintetizados por la célula?

12. Inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos Sugiera posibles mecanismos para la inhibición de (a) la alanina racemasa por la L-fluoroalanina y (b) las glutamina amidotransferasas por la azaserina.

13. Modo de acción de las sulfamidas Algunas bacterias necesitan la presencia de *p*-aminobenzoato en el medio de cultivo para su crecimiento normal. El crecimiento de estas bacterias se inhibe de forma importante al añadir sulfanilamida, una de las primeras sulfamidas. Además, en presencia de este medicamento, se acumula en el medio de cultivo el compuesto 5'-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR; véase la Fig. 22-35). Estos efectos se invierten al añadir al medio un exceso de *p*-aminobenzoato.



p-Aminobenzoato Sulfanilamida

(a) ¿Cuál es el papel del *p*-aminobenzoato en estas bacterias? (Sugerencia: Véase la Fig. 18-16).

(b) ¿Por qué se acumula AICAR en presencia de sulfanilamida?

(c) ¿Por qué la inhibición y la acumulación pueden invertirse al añadir un exceso de *p*-aminobenzoato?

14. Ruta del carbono en la biosíntesis de pirimidinas Pronostique la localización del ^{14}C en el orotato aislado de células que hayan crecido en presencia de una pequeña cantidad de succinato marcado uniformemente con ^{14}C? Dé una explicación.

CopyStation

15. Los nucleótidos son fuentes pobres de energía En condiciones de inanición, los organismos pueden usar proteínas y aminoácidos como fuentes de energía. La desaminación de los aminácidos produce esqueletos carbonados que pueden entrar en la ruta glucolítica y en el ciclo del ácido cítrico para producir energía en forma de ATP. Por su parte, los nucleótidos no se degradan de forma similar para su uso como combustibles. ¿Qué observaciones sobre la fisiología celular apoyan esta afirmación? ¿Qué aspecto de la estructura de los nucleótidos les hace una fuente relativamente pobre en energía?

16. Tratamiento de la gota El alopurinol (véase la Fig. 22-50), un inhibidor de la xantina oxidasa, se utiliza para tratar la gota crónica. Explique las bases bioquímicas de este tratamiento. Los pacientes tratados con alopurinol a veces pueden desarrollar cálculos de xantina en el riñón, aunque la incidencia de la lesión renal es muy inferior que en la gota sin tratar. Explique esta observación teniendo en cuenta las siguientes solubilidades en la orina: ácido úrico, 0,15 g/L; xantina, 0,05 g/L e hipoxantina, 1,4 g/L.

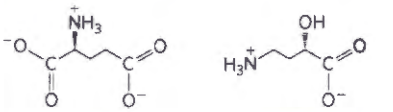
17. Inhibición de la síntesis de nucleótidos por la azaserina El compuesto diazo *O*-(2-diazoacetil)-L-serina, también conocido como azaserina (véase la Fig. 22-51), es un potente inhibidor de las glutamina amidotransferasas. Si las células en crecimiento se tratan con azaserina, ¿qué intermediarios de la biosíntesis de nucleótidos se acumularán? Explíquelo.

Problema de Análisis de Datos

18. Utiliación de las técnicas moleculares modernas para establecer la vía biosintética de un nuevo aminoácido La mayoría de las rutas biosintéticas descritas en este capítulo fueron establecidas antes del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y la genómica, por lo que las técnicas fueron muy diferentes de las que hoy se utilizarían. Desarrollaremos un ejemplo de la aplicación de las técnicas moleculares modernas a la investigación de la ruta de síntesis de un nuevo aminoácido, (2*S*)-4-amino-2-hidroxibutirato (AHBA). Las técnicas que aquí se mencionan se describen en diversos lugares del libro; este problema pretende mostrar cómo éstas pueden combinarse en función de un objetivo.

El AHBA es un *g*-aminoácido que forma parte de algunos antibióticos aminoglucósidos, entre ellos la butirosina. Los antibióticos modificados por adición de un residuo AHBA son a menudo más resistentes frente a la inactivación por los enzimas bacterianos de resistencia a antibióticos. Por ello, saber cómo se sintetiza y se incorpora el AHBA a los antibióticos puede ser útil en el diseño de fármacos.

En un artículo publicado en 2005, Li y colaboradores describen cómo determinaron la ruta de biosíntesis del AHBA a partir de glutamato.



Glutamato AHBA

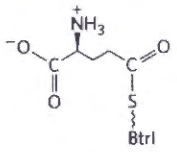
Describa brevemente las transformaciones químicas necesarias para convertir el glutamato en AHBA. De momento, no se preocupe del *orden* de las reacciones.

Li y colaboradores empezaron por clonar el agrupamiento de genes responsables de la síntesis de la butirosina de la bacteria *Bacillus circulans*, que sintetiza grandes cantidades de butirosina. Identificaron cinco genes esenciales para la ruta: *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* y *btrV*. Clonaron estos genes en plásmidos de *E. coli* que permiten la sobrexpresión de los genes y producen proteínas con "etiquetas de histidina" (véase la Sección 9.1) en el extremo amino-terminal para facilitar su purificación.

La secuencia de aminoácidos predicha para la proteína BtrI mostraba una gran homología de secuencia con las proteínas transportadoras de acilo (véase la Fig. 21-5). Mediante espectrometría de masas, Li y colaboradores encontraron que la masa molecular de la proteína BtrI purificada era 11.812 (incluyendo la etiqueta de His). Después de incubar con coenzima A y un enzima capaz de unir CoA a otras proteínas transportadoras de acilo, la mayoría de especies moleculares poseían una *M*r de 12.153.

(b) ¿Cómo utilizaría estos datos para argumentar que BtrI puede actuar como una proteína transportadora de acilos con CoA como grupo prostético?

De acuerdo con la terminología estándar, Li y colaboradores denominaron la proteína sin CoA apo-BtrI y la proteína con CoA (unida tal como se muestra en la Fig. 21-5) holo-BtrI. Cuando holo-BtrI se incubaba con glutamina, ATP y proteína BtrJ purificada, la especie holo-BtrI de *M*r 12.153 era sustituida por una especie de *M*r 12.281, correspondiente al tioéster de glutamato y holo-BtrI. A partir de estos datos, los autores propusieron la siguiente estructura para la especie de M_r 12.281 (*g*-glutamil-*S*-BtrI):



(c) ¿Qué otra(s) estructura(s) son compatibles con los datos anteriores?

(d) Li y colaboradores argumentaron que la estructura aquí mostrada (*g*-glutamil-*S*-BtrI) probablemente fuese correcta porque el grupo α-carboxilo debía eliminarse en algún punto del proceso de síntesis. Explique la base química de esta argumentación (sugerencia: véase la Fig. 18-6, reacción C).

La proteína BtrK mostró una homolgía considerable con las aminoácido descarboxilasas dependientes de PLP y la BtrK aislada de *E. coli* resultó contener PLP fuertemente unido. Cuando se incubó la *g*-glutamil-*S*-BtrI con BtrK purificada se obtuvo una especie de M_r 12.240.

(e) ¿Cuál es la estructura más probable de esta especie?

(f) Es destacable que cuando se incubaba glutamato y ATP con BtrI, BtrJ y BtrK purificadas se obtenía una especie molecular de M_r 12.370. ¿Cuál es la estructura más probable de esta especie? Sugerencia: Recuerde que BtrJ puede usar ATP para *g*-glutamilar grupos nucleofílicos.

Li y colaboradores encontraron que BtrO es homóloga de los enzimas monooxigenasa (véase el Recuadro 21-1) que hidroxilan alcanos, usando FMN como cofactor, y que BtrV es homóloga de una NAD(P)H oxidorreductasa. Otros dos genes del agrupamiento, *btrG* y *btrH*, probablemente codifican enzimas que eliminan el grupo *g*-glutamilo y unen AHBA a la molécula de antibiótico diana.

(g) Sobre la base de estos datos, proponga una ruta plausible para la síntesis de AHBA y su unión a un antibiótico diana. Incluya los enzimas que catalizan cada etapa y cualesquiera sustratos o cofactores que sean necesarios.

Referencia

Li, Y., N.M. Llewellyn, R. Giri, F. Huang, and J.B. Spencer. 2005. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein–mediated pathway. *Chem. Biol.* 12:665–675.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

COPY-STATION

CAPÍTULO 23

Regulación hormonal e integración del metabolismo de los mamíferos

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas 899

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo 910

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético 922

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal 931

23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 941

COPYSTATION

Del capítulo 13 al 22 hemos revisado el metabolismo a nivel de la célula individual, haciendo hincapié en aquellas rutas metabólicas comunes a casi todas las células, bacterianas, arqueas y eucarióticas. Hemos visto de qué modo se regulan los procesos metabólicos celulares a nivel de reacciones enzimáticas individuales, mediante la disponibilidad de sustrato, los mecanismos alostéricos, la fosforilación u otras modificaciones covalentes de los enzimas.

Para entender plenamente el significado de las rutas metabólicas individuales y su regulación, debemos considerarlas en el contexto del conjunto del organismo. Una característica esencial de los organismos multicelulares es la diferenciación celular y la división del trabajo. Los tejidos y órganos de los organismos complejos, tales como los humanos, tienen funciones especializadas y, por lo tanto, tienen unos requerimientos energéticos y unos patrones metabólicos característicos. Las señales hormonales y neuronales integran y coordinan las actividades metabólicas de los distintos tejidos, con una distribución optima de precursores y sustratos energéticos entre los distintos órganos.

Este capítulo se ocupa del metabolismo especializado de los principales órganos y tejidos de los mamíferos y de la integración del metabolismo en el organismo completo. Empezaremos examinando la amplia variedad de tipos de hormonas y de mecanismos hormonales para fijarnos seguidamente en las funciones específicas de tejido reguladas por estos mecanismos. Repasaremos la distribución de los nutrientes entre los distintos órganos, en la que el hígado juega un papel central, y la cooperación metabólica entre estos órganos. Para ilustrar el papel integrador de las hormonas, describiremos la interrelación de la insulina, el glucagón y la adrenalina en la coordinación del metabolismo energético en el músculo, hígado y tejido adiposo. Otras hormonas, producidas en el tejido adiposo, músculo, intestinos y cerebro, también juegan papeles clave en la coordinación del metabolismo y del comportamiento. Examinaremos la regulación hormonal a largo plazo de la masa corporal y, finalmente, el papel de la obesidad en el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

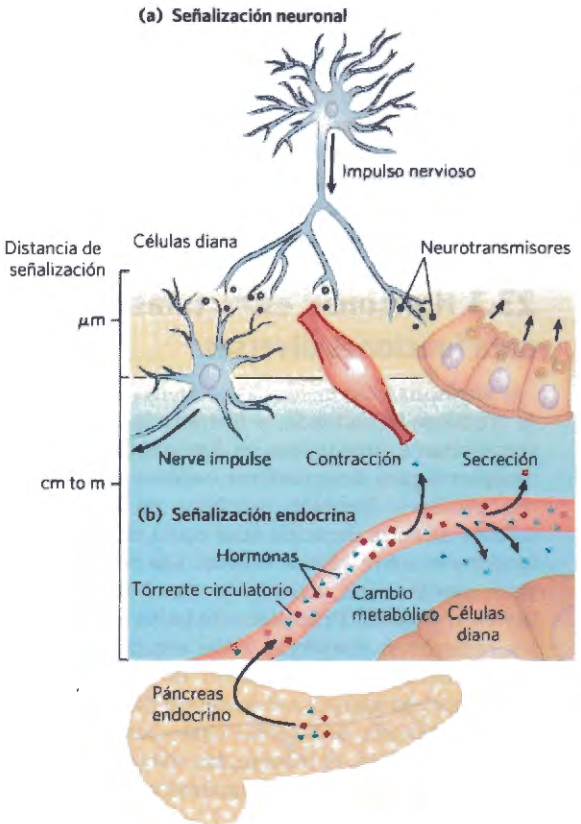
23.1 Hormonas: estructuras diversas para funciones diversas

Las **hormonas** son moléculas pequeñas o proteínas que se producen en un tejido, se liberan a la circulación y se transportan a otros tejidos en donde actúan a través de receptores para desencadenar cambios en las actividades celulares. También incluimos en esta discusión señales de corta duración tales como el NO, que actúa localmente sobre células vecinas. Las hormonas sirven para coordinar las actividades metabólicas de varios tejidos u órganos. Prácticamente todos los procesos en los organismos complejos están regulados por una o más hormonas: el mantenimiento de la presión arterial, el volumen sanguíneo y el equilibrio de los electrolitos, la embriogénesis, la diferenciación sexual, el desarrollo y la reproducción, el hambre, los comportamientos alimenticios, la digestión y el suministro de combustibles,

por citar unos pocos. Examinaremos aquí métodos para detectar y medir hormonas y las interacciones con sus receptores y describiremos una muestra representativa de tipos de hormonas.

La coordinación del metabolismo en los mamíferos corre a cargo del **sistema neuroendocrino**. Las células individuales de un tejido detectan un cambio en el entorno del organismo y responden segregando un mensajero químico que pasa a otra célula del mismo o de un tejido diferente, donde se une a una molécula receptora y desencadena un cambio en esta célula diana. En la señalización neuronal **(Fig. 23-1a)**, el mensajero químico es un neurotransmisor (por ejemplo, acetilcolina) y puede que viaje solamente una fracción de micrómetro a través de una hendidura sináptica hasta la siguiente neurona de la red. En la señalización hormonal, los mensajeros, las hormonas, son transportados por la sangre hasta células próximas o a órganos y tejidos distantes; pueden viajar más de un metro hasta encontrar su célula diana (Fig 23-1b). Excepto por esta diferencia anatómica, estos dos mecanismos de señalización química son notablemente parecidos. La adrenalina y la noradrenalina, por ejemplo, actúan como neurotransmisores en algunas sinapsis del cerebro y uniones neuromusculares del músculo liso y también como hormonas que regulan el metabolismo energético en el hígado y en el músculo. En la siguiente discusión de la señalización celular haremos hincapié en la acción de las hormonas basándonos en los contenidos del metabolismo energético de capítulos anteriores, pero la mayor parte de los mecanismos fundamentales que aquí se describen también están presentes en la acción de los neurotransmisores.

Copy-Station



La detección y la purificación de las hormonas requieren un bioensayo

¿Cómo se detecta y aísla una hormona? En primer lugar hay que identificar un proceso fisiológico en un tejido que dependa de una señal originada en otro tejido. La insulina, por ejemplo, fue identificada como una sustancia producida en el páncreas que afectaba la concentración de glucosa en la sangre y en la orina (Recuadro 23-1). Una vez se ha descubierto el efecto fisiológico de una supuesta hormona, es posible desarrollar un ensayo biológico cuantitativo para la hormona. En el caso de la insulina, el ensayo consistió en inyectar extractos de páncreas (una fuente cruda de insulina) en animales de experimentación deficientes en insulina, cuantificándose a continuación los cambios resultantes en la concentración de glucosa en sangre y en orina. Para aislar una hormona, se fraccionan extractos que contienen la supuesta hormona con las mismas técnicas usadas en la purificación de otras biomoléculas (fraccionamiento con disolventes, cromatografía y electroforesis) y se analiza la actividad hormonal en cada fracción. Una vez se ha purificado el material, es posible determinar su composición química y su estructura.

Este protocoloo para la caracterización de las hormonas es engañosamente sencillo. Las hormonas son tan potentes que se producen sólo en muy pequeñas cantidades. La obtención de cantidades suficientes de hormona para permitir su caracterización química a menudo implica el aislamiento bioquímico a gran escala. Cuando Andrew Schally y Roger Guillemin purificaron y caracterizaron independientemente la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) del hipotálamo, ¡el grupo de Schally procesó unas veinte toneladas de hipotálamos obtenidos de cerca de dos millones de ovejas, mientras que el grupo de Guillemin extrajo los hipotálamos de un millón de cerdos. La TRH resultó ser un simple derivado del tripéptido Glu-His-Pro **(Fig. 23-2)**. Una vez se conoció la estructura de la hormona, pudo ser sintetizada químicamente en grandes cantidades para ser usada en estudios fisiológicos y bioquímicos. Por su trabajo sobre las hormonas hipotalámicas, Schally y Guillemin compartieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1977 junto con Rosalyn Yalow, que (con Solomon A. Berson) desarrolló el extraordinariamente sensible **radioinmunoensayo (RIA)** para hormonas peptídicas y que utilizó en el estudio de la acción hormonal. Esta técnica revolucio-

FIGURA 23-1 Señalización utilizada en el sistema neuroendocrino. **(a)** En la señalización neuronal, se transmiten señales eléctricas (impulsos nerviosos) que se originan en el cuerpo celular de una neurona y viajan muy rápidamente cubriendo largas distancias hasta el extremo del axón en donde se liberan los neurotransmisores que difunden hasta la célula diana. La célula diana (otra neurona, un miocito o una célula secretora) se halla tan solo a una fracción de micrómetro o a pocos micrómetros del sitio de liberación del neurotransmisor. **(b)** En el sistema endocrino, se secretan hormonas (tales como la insulina producida en las células β pancreásticas) a la circulación sanguínea, que las transporta a través del cuerpo hasta los tejidos diana, que pueden hallarse a más de un metro de distancia de la célula secretora. Tanto los neurotransmisores como las hormonas interaccionan con receptores específicos que se hallan en la superficie o en el interior de la célula diana, desencadenando respuestas.

RECUADRO 23-1 MEDICINA ¿Cómo se descubre una hormona? El difícil camino hasta la insulina purificada

Millones de personas con diabetes mellitus tipo 1 se inyectan diariamente con insulina pura para compensar que sus propias células β pancreáticas no la produzcan. La inyección de insulina no cura la diabetes, pero permite que personas, que de otro modo habrían muerto jóvenes, puedan desarrollar vidas largas y productivas. El descubrimiento de la insulina, que tuvo su origen en una observación casual, ilustra la combinación de buena suerte y cuidadosa experimentación que ha permitido el descubrimiento de muchas hormonas.

En 1889, Oscar Minkowsky, un joven asistente de la Facultad de Medicina de Estrasburgo, y Josef von Mering, del Instituto Hoppe-Seyler también de Estrasburgo, tuvieron una disputa amistosa acerca de si el páncreas, cuyo contenido en lipasas era conocido, era importante en la digestión de las grasas en el perro. Para resolver el tema emprendieron un experimento sobre la digestión de las grasas. Extirparon quirúrgicamente el páncreas de un perro, pero antes de que el experimento fuese más adelante, Minkowsky observó que el perro producía mucha más orina de la normal (un síntoma común de la diabetes no tratada). La orina del perro también tenía niveles de glucosa muy por encima de los normales (otro síntoma de la diabetes). Estos hallazgos sugerían que la falta de algún producto pancreático provocaba la diabetes.

Minkowsky trató sin éxito de preparar un extracto de páncreas de perro que invirtiera el efecto de eliminar el páncreas; es decir, disminuir los niveles de glucosa en la orina y en la sangre. Ahora sabemos que la insulina es una proteína y que el páncreas es muy rico en proteasas (tripsina y quimotripsina), que son liberadas directamente en el intestino delgado para ayudar a la digestión. Estas proteasas sin duda degradaron la insulina en los extractos pancreáticos de Minkowsky.

A pesar de esfuerzos considerables, no se realizó ningún progreso en el aislamiento o en la caracterización del "factor antidiabético" hasta el verano de 1921, cuando Frederick G. Banting, un joven científico que trabajaba en el laboratorio de J. J. R. MacLeod en la Universidad de Toronto, y un estudiante, Charles Best, afrontaron el problema. Por aquel entonces, diferentes indicios señalaban a un grupo de células especializadas del páncreas (los islotes de Langerhans, véase la Fig. 23-27) como la fuente del factor antidiabético, que por ello fue llamado insulina (del latín *insula*, "isla").

Tomando las precauciones oportunas para evitar la proteólisis, Banting y Best (más tarde ayudados por el bioquímico J. B. Collip) lograron preparar en diciembre de 1921 un extracto pancreático purificado que curaba los síntomas de la diabetes experimental en los perros. El 25 de enero de 1922 (¡sólo un mes más tarde!) su preparación de insulina fue inyectada a Leonard Thompson, un muchacho de 14 años gravemente enfermo de diabetes mellitus. En pocos días los niveles de cuerpos cetónicos y de glucosa en la orina de Thompson descendieron notablemente; el extracto salvó su vida y las de muchos otros niños gravemente enfermos que también recibieron estas primeras preparaciones (Fig. 1). En 1923, Banting y MacLeod ganaron el Premio Nobel por el aislamiento de la insulina. Banting anunció inmediatamente que compartiría su premio con Best; MacLeod compartió el suyo con Collip.

Ya en 1923, las compañías farmacéuticas suministrahan insulina extraída de páncreas porcino a miles de paciente de todo el mundo. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética en la década de 1980, fue posible producir cantidades ilimitadas de insulina humana, introduciendo el gen clonado de la insulina humana en un microorganismo cultivable a escala industrial. Actualmente, algunos pacientes llevan implantadas bombas de insulina que liberan cantidades de insulina variables, de acuerdo con las necesidades en las comidas y durante el ejercicio. Hay perspectivas razonables de que en el futuro el transplante de tejido pancreático proporcione una fuente de insulina que responda como un páncreas normal, es decir, liberando insulina al torrente circulatorio sólo cuando aumente la glucosa sanguínea.

COPY STATION

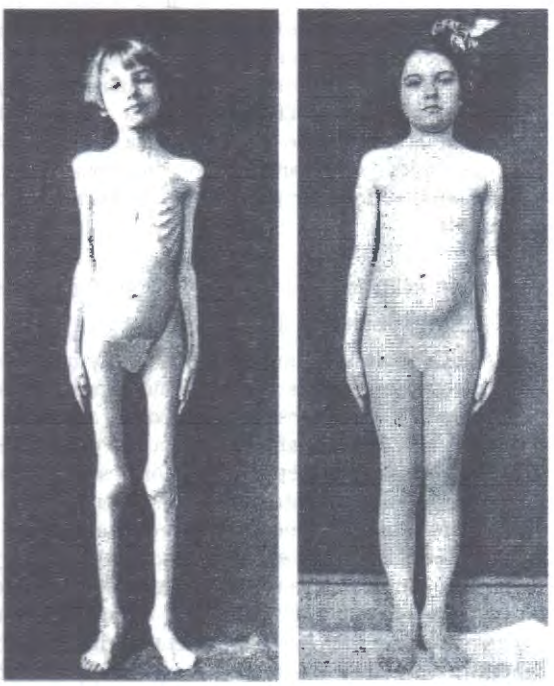


FIGURA 1 Una niña con diabetes tipo 1 antes (izquierda) y después (derecha) de tres meses de tratamiento con una preparación de insulina de los primeros tiempos. [Fuente: H. R. Geyelin et al., *J. Metabol. Res.* 2:767, 1923.]

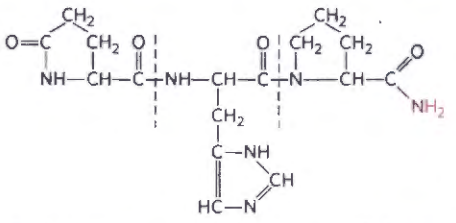


FIGURA 23-2 Estructura de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH). Purificada (después de esfuerzos heroicos) a partir de extractos de hipotálamo, la TRH resultó ser un derivado del tripéptido Glu-His-Pro. El grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu amino-terminal forma una amida (enlace en rojo) con el grupo α-amino, formándose piroglutamato; el grupo carboxilo de la Pro carboxi-terminal se convierte en una amida ($-NH_2$ en rojo). Tales modificaciones son comunes entre los péptidos hormonales pequeños. En una proteína típica de M_r ~ 50.000, las cargas en los residuos amino y carboxi-terminales contribuyen relativamente poco a la carga global de la proteína, pero en un tripéptido estas dos cargas dominan las propiedades de la molécula. La formación de los derivados amida elimina estas cargas.

nó la investigación de las hormonas al hacer posible la medida rápida, cuantitativa y específica de muy pequeñas cantidades de hormonas.

Los anticuerpos específicos de las hormonas son la clave del RIA y de su equivalente moderno, el **ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA**; véase la Fig. 5-26b). La hormona purificada inyectada a conejos ratones o gallinas estimula la síntesis de anticuerpos que se unen a la hormona con gran afinidad y especificidad. Estos anticuerpos se pueden purificar y marcar radioisotópicamente (para el RIA) o conjugarse con un enzima que da lugar a un producto coloreado (para ELISA). Los anticuerpos marcados se dejan interaccionar a continuación con los extractos que contienen la hormona. La fracción de anticuerpo unida por la hormona en el extracto se cuantifica mediante detección de la radiación o por fotometría. Debido a la elevada afinidad entre anticuerpo y hormona estos ensayos pueden detectar picogramos de hormona en una muestra.

Las hormonas actúan a través de receptores celulares específicos de elevada afinidad

En el Capítulo 12 vimos que todas las hormonas actúan a través de receptores muy específicos, presentes en las células diana sensibles a las hormonas, a los que éstas se unen con elevada afinidad. Cada tipo celular tiene su propio surtido de receptores hormonales, que definen la gama de su respuesta hormonal. Además, dos tipos celulares con el mismo tipo de receptor pueden tener distintas dianas intracelulares de acción hormonal y, por lo tanto, pueden responder de forma distinta a la misma hormona. La especificidad de la acción hormonal es consecuencia de la complementariedad estructural entre la hormona y su receptor; esta interacción es extremadamente selectiva, lo que permite que hormonas estructuralmente similares tengan efectos diferentes si se unen de manera preferente a receptores distintos. La elevada afinidad de la interacción permite que las células respondan a concentraciones muy bajas de hormonas. En el diseño de fármacos dirigidos a influir en la regulación hormonal es necesario conocer la especificidad relativa y la afinidad del fármaco y de la hormona natural.

Las consecuencias intracelulares de la interacción receptor-ligando son de, al menos, cinco tipos generales: (1) un segundo mensajero (tal como el cAMP, cGMP o el inositol trisfosfato) generado en el interior de la célula actúa como regulador alostérico de uno o varios enzimas; (2) un receptor tirosina quinasa es activado por la hormona extracelular; (3) un cambio del potencial de membrana resultante de la apertura o del cierre de un canal iónico regulado por hormonas; (4) una molécula esteroide o de tipo esteroide produce un cambio en el nivel de expresión (transcripción del DNA en mRNA) de uno o de varios genes, facilitado por un receptor hormonal nuclear proteico (véase la Fig. 12-2).

Las hormonas peptídicas y de tipo amina hidrosolubles (insulina y adrenalina, por ejemplo), actúan extracelularmente uniéndose a receptores de la superficie celular que abarcan el espesor de la membrana plasmática **(Fig. 23-3)**. Cuando la hormona se une al dominio extracelular, el receptor experimenta un cambio de conformación análogo al producido por la unión de una molécula efectora en un enzima alostérico. El cambio de conformación desencadena el efecto de la hormona. Con los receptores **metabotrópicos**, el cambio activa o inhibe un enzima que actúa con posterioridad al receptor; con los receptores **ionotrópicos**, un canal iónico de la membrana plasmática se abre o cierra dando como resultado un cambio en el potencial de membrana (ΔV_m) o en la concentración de un ión como el Ca^{2+}.

Una única molécula de hormona, al formar un complejo hormona-receptor, activa un catalizador que produce muchas moléculas de segundo mensajero, de manera que el receptor sirve no sólo de transductor de señales, sino también de amplificador de señales. La señal puede amplificarse aún más a través de una cascada de señalización, con una serie de pasos en cada uno de los cuales un catalizador (por ejemplo, una proteína quinasa) activa a otro catalizador (otra proteína quinasa), con el resultado de una gran amplificación de la señal original. Una cascada de este tipo tiene lugar en la regulación de la síntesis y degradación del glucógeno por la adrenalina (véase la Fig. 12-7). La adrenalina activa (a través de su receptor) a la adenilil ciclasa, que produce muchas moléculas de cAMP por cada molécula de hormona unida a su receptor. El AMP cíclico, a su vez, activa a la proteína quinasa dependiente de cAMP (proteína quinasa A), que activa la glucógeno fosforilasa *b* quinasa, que activa la glúcogeno fosforilasa *b*. El resultado es la amplificación de la señal: una molécula de adrenalina da lugar a la producción de muchos miles o millones de moléculas de glucosa 1-fosfato a partir del glucógeno.

Las hormonas insolubles en agua, incluidas las hormonas esteroides, retinoides y tiroideas, pasan fácilmente a través de la membrana plasmática de sus células diana para alcanzar sus proteínas receptoras en el núcleo (Fig. 23-3). El propio complejo hormona-receptor transporta el mensaje: interacciona con el DNA, alterando la expresión de genes específicos con lo que cambia el complemento enzimático de la célula y, por tanto, su metabolismo celular (véase la Fig. 12-30).

Copy Station

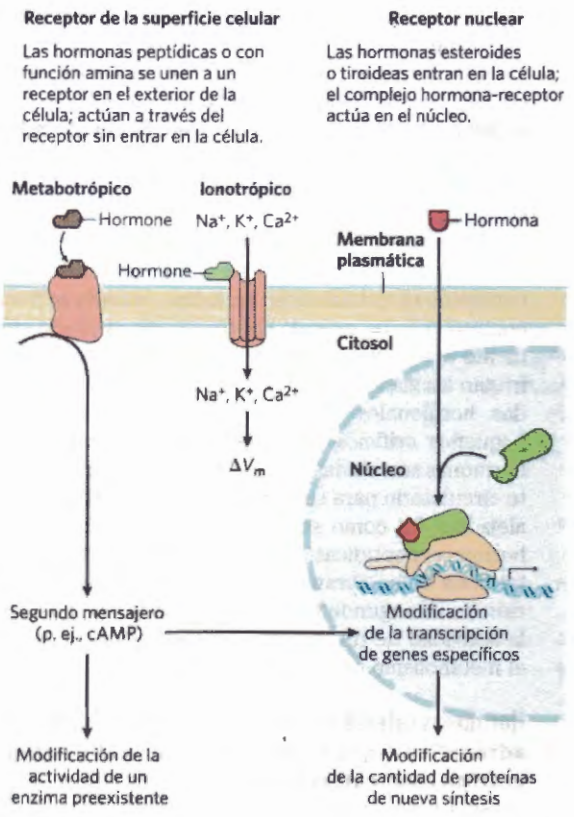


FIGURA 23-3 Dos mecanismos generales de acción hormonal. Las hormonas peptídicas y las aminadas actúan más rápidamente que las hormonas esteroides y tiroideas.

COPYSTATION

Las hormonas que actúan a través de receptores de la membrana plasmática desencadenan, generalmente, respuestas fisiológicas o bioquímicas muy rápidas. Sólo segundos después de que la adrenalina sea segregada en la sangre por la médula suprarrenal, el músculo esquelético responde acelerando la degradación del glucógeno. Por el contrario, las hormonas tiroideas y las hormonas sexuales (esteroides) promueven la respuesta máxima en los tejidos diana sólo al cabo de horas o incluso días. Estas diferencias en el tiempo de respuesta corresponden a diferentes modos de acción. En general, las hormonas de acción rápida modifican la actividad de uno o más enzimas preexistentes en la célula a través de mecanismos alostéricos o por modificación covalente. Las hormonas de acción lenta generalmente alteran la expresión génica, lo que da como resultado una síntesis mayor (regulación hacia arriba o "upregulation") o menor (regulación hacia abajo o "downregulation") de las proteínas sujetas a regulación.

Las hormonas son químicamente diversas

Hay varias clases de hormonas en los mamíferos, distinguibles por sus estructuras químicas y sus modos de acción (Tabla 23-1). Las hormonas peptídicas, catecolaminas e icosanoides actúan desde el exterior de las células diana, a través de receptores de la superficie celular. Las hormonas esteroides, la vitamina D, los retinoides y las tiroideas penetran en la célula y actúan a través de receptores nucleares. El óxido nítrico (un gas) también entra en la célula, pero activa un enzima citosólico, la guanilil ciclasa (véase la Fig. 12-23).

Las hormonas también pueden clasificarse por la forma como viajan desde el punto de su liberación hasta su tejido diana. Las hormonas **endocrinas** (del griego *endon*, que significa "dentro", y *krinein*, "liberar") se liberan a la sangre y se transportan hasta las células diana a través del organismo (por ejemplo, la insulina y el glucagón). Las hormonas **paracrinas** se liberan en el espacio extracelular y difunden hacia las células diana vecinas (las hormonas icosanoides son de este tipo). Las hormonas **autocrinas** afectan a la misma célula que las libera, uniéndose a receptores de la superficie celular.

Los mamíferos no son los únicos que poseen sistemas hormonales de señalización. Los insectos y los gusanos nemátodos tienen sistemas de regulación hormonal muy desarrollados, cuyos mecanismos fundamentales son similares a los de los mamíferos. Las plantas también usan señales hormonales para coordinar las actividades de sus tejidos.

Para ilustrar la diversidad estructural y el abanico de efectos de las hormonas de los mamíferos, consideremos algunos ejemplos representativos de cada una de las clases principales que se muestran en la Tabla 23-1.

Hormonas peptídicas Las **hormonas peptídicas** varían en tamaño desde 3 a más de 200 residuos aminoácidos. Incluyen las hormonas pancreáticas insulina, glucagón y somatostatina, la hormona paratiroidea calcitonina y

TABLA 23-1 Clases de hormonas

Tipo	Ejemplo	Vía de síntesis	Modo de acción
Péptido	Insulina, glucagón	Modificación proteolítica de una prohormona	Receptores de la membrana plasmática; segundos mensajeros
Catecolamina	Adrenalina	De la tirosina	
Icosanoide	Prostaglandina E_2	Del araquidonato (ácido graso 20:4)	
Esteroide	Testosterona	Del colesterol	Receptores nucleares; regulación de la transcripción
Vitamina D	Calcitriol	Del colesterol	
Retinoide	Acido retinoico	De la vitamina A	
Tiroides	Triyodotironina (T_3)	De la Tyr de la tiroglobulina	
Oxido nítrico	Óxido nítrico	De arginina + O_2	Receptor citosólico (guanilil ciclasa) y segundo mensajero (cGMP)

todas las hormonas del hipotálamo y la hipófisis (descritas más adelante). Estas hormonas se sintetizan en los ribosomas como proteínas precursoras más largas (prohormonas), se empaquetan en vesículas secretoras y se escinden por proteólisis para formar los péptidos activos. En muchas hormonas peptídicas los residuos terminales están modificados como, por ejemplo, en la TRH (Fig. 23-2).

La **insulina** es una proteína pequeña (M_r 5.800) con dos cadenas polipeptídicas, A y B, unidas por dos puentes disulfuro. Se sintetiza en el páncreas en forma de precursor inactivo de una sola cadena polipeptídica, la preproinsulina **(Fig. 23-4)**, con una "secuencia señal" amino-terminal, que determina su incorporación a vesículas secretoras. (Las secuencias señal se discuten en el Capítulo 27; véase la Fig. 27-40). La eliminación proteolítica de la secuencia señal y la formación de tres puentes disulfuro produce la proinsulina, que se almacena en gránulos de secreción (vesículas membranosas rellenas de proteína sintetizada en el RE) en las células β pancreáticas. Cuando el aumento de la glucosa en sangre es suficiente para desencadenar la secreción de insulina, la proinsulina se convierte en insulina activa por proteasas específicas, que cortan dos enlaces peptídicos para formar la molécula de insulina madura y el péptido C que se liberan a la sangre por exocitosis.

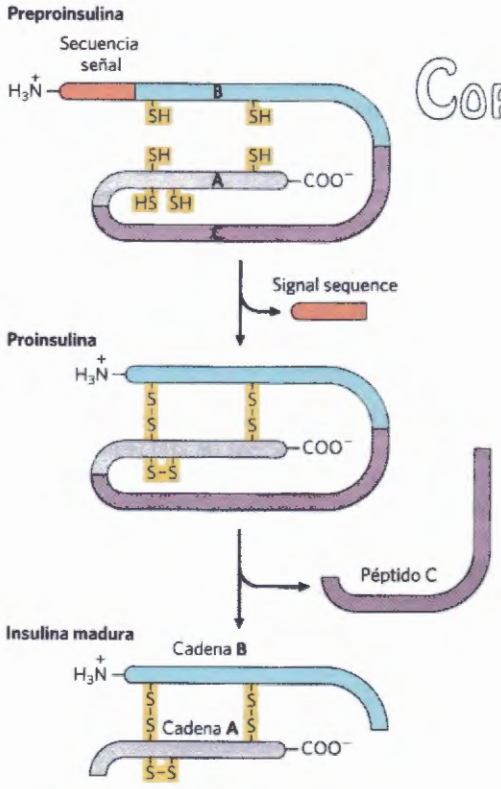


FIGURA 23-4 insulina. La insulina madura se forma a partir de un precursor más grande, la preproinsulina, por modificación proteolítica. La eliminación de un segmento de 23 aminoácidos (la secuencia señal) del extremo amino-terminal de la preproinsulina y la formación de tres puentes disulfuro dan lugar a la proinsulina. Cortes proteolíticos posteriores eliminan el péptido C de la proinsulina, dando lugar a la insulina madura, compuesta por las cadenas A y B. La secuencia de aminoácidos de la insulina bovina se muestra en la Figura 3-24.

Hay otros casos, en los que las proteínas prohormonas experimentan una rotura específica y producen varias hormonas activas. La proopiomelanocortina (POMC) es un ejemplo espectacular de codificación de múltiples hormonas por un solo gen. El gen de la POMC codifica un gran polipéptido que se corta progresivamente en al menos nueve péptidos biológicamente activos **(Fig. 23-5)**.

La concentración de las hormonas peptídicas en el interior de los gránulos de secreción es tan alta, que el contenido es virtualmente cristalino; cuando se libera el contenido de un gránulo por exocitosis, se libera súbitamente una gran cantidad de hormona. Los capilares que irrigan las glándulas endocrinas sintetizadoras de péptidos hormonales están aventanadas (puntuadas con pequeños orificios o "ventanas"), de manera que las hormonas secretadas puedan llegar fácilmente al torrente circulatorio para su transporte hasta las células diana alejadas. Tal como se indicó anteriormente, todas las hormonas peptídicas actúan mediante la unión a receptores de la membrana plasmática. Provocan la producción de un segundo mensajero en el citosol, que cambia la actividad de un enzima intracelular, modificando así el metabolismo celular.

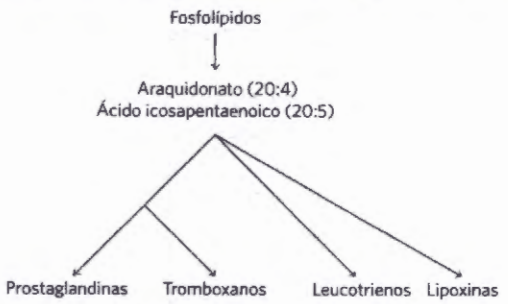
Hormonas catecolaminas Los compuestos hidrosolubles **adrenalina (epinefrina)** y **noradrenalina (norepinefrina)** son **catecolaminas**, sintetizadas a partir de tirosina y denominadas así por su relación estructural con el catecol (véase la Fig. 22-31).

COPY-STATION

Tirosina ⟶ L-Dopa ⟶ Dopamina ⟶ Noradrenalina ⟶ Adrenalina

Las catecolaminas sintetizadas en el cerebro y otros tejidos nerviosos actúan como neurotransmisores, pero la adrenalina y la noradrenalina también se sintetizan y secretan como hormonas por las glándulas suprarrenales (adrenales). Al igual que las hormonas peptídicas, las catecolaminas se encuentran muy concentradas en gránulos de secreción, se liberan por exocitosis y actúan a través de receptores de superficie para generar segundos mensajeros intracelulares. Intervienen en una gran variedad de respuestas fisiológicas frente al estrés agudo (véase la Tabla 23-7).

Hormonas icosanoides Las hormonas icosanoides (prostaglandinas, tromboxanos leucotrienos y lipoxinas) proceden del araquidonato (20:4($\Delta^{5,8,11,14}$), un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos y del ácido icosapentaenoico (EPA; 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$); véase la Fig. 21-12)..

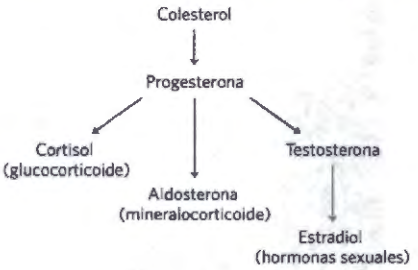


A diferencia de las hormonas descritas hasta el momento, no se sintetizan con antelación ni se almacenan; se

producen cuando se necesitan. Los enzimas de la vía de las prostaglandinas y los tromboxanos están ampliamente distribuidos en los tejidos de los mamíferos; la mayoría de las células pueden producir estas señales hormonales, y las células de muchos tejidos pueden responder a través de receptores específicos de la membrana plasmática. Las hormonas icosanoides son hormonas paracrinas secretadas en el fluido intersticial (sin preferencia por la sangre) y actúan sobre las células vecinas.

Algunas prostaglandinas estimulan la contracción del músculo liso, incluidos el del intestino y del útero (y pueden, por lo tanto, ser usadas clínicamente para inducir el parto). También están implicadas en el dolor y la inflamación en algunos tejidos. Muchos fármacos de acción antiinflamatoria actúan inhibiendo pasos de las vías de síntesis de las prostaglandinas (véase la Fig. 21-15). Los tromboxanos regulan la función de las plaquetas y, por lo tanto, la coagulación sanguínea (véase la Fig. 6-41). Los leucotrienos LTC_4 y LTD_4 actúan a través de receptores de la membrana plasmática estimulando la contracción del músculo liso en el intestino, las vías pulmonares y la tráquea, y son mediadores de la anafilaxis una respuesta inmune severa que puede incluir constricción de las vías respiratorias, pulso cardíaco alterado, shock y, a veces, la muerte. Las lipoxinas son derivados icosanoides de vida corta con efectos potentes sobre la función inmune; aparecen en la sangre cuando finaliza la inflamación. ■

Hormonas esteroides Las **hormonas esteroides**: hormonas corticoesteroides (adrenocorticoides) y hormonas sexuales, se sintetizan a partir del colesterol en varios tejidos endocrinos.



Viajan hasta sus células diana a través del torrente circulatorio, unidas a proteínas transportadoras. En el córtex suprarrenal se producen más de 50 hormonas corticosteroides mediante reacciones que eliminan la cadena lateral del anillo D del colesterol e introducen oxígeno para formar grupos ceto e hidroxilo. En muchas de estas reacciones intervienen enzimas del citocromo P-450 (véase el Recuadro 21-1). Los corticoesteroides son de dos tipos generales, según sus acciones. Los glucocorticoides, tales como el cortisol, afectan principalmente el metabolismo de los glúcidos; los mineralocorticoides, tales como la aldosterona, regulan las concentraciones de electrolitos (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-) en la sangre. Dos tipos de hormonas sexuales, los andrógenos (testosterona) y los estrógenos (tales como el estradiol; véase la Fig. 10-18) se sintetizan en los testículos y en los ovarios. Afectan al desarrollo sexual, el comportamiento sexual y a una serie de funciones reproductoras y no reproductoras. Su síntesis también requiere enzimas del citocromo P-450, que cortan la cadena lateral del colesterol e introducen átomos de oxígeno.

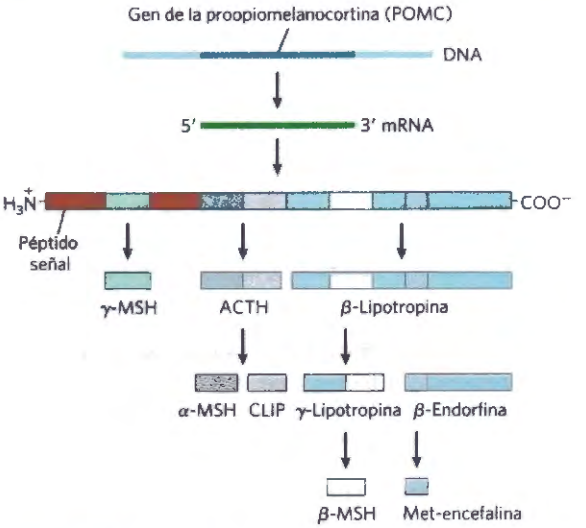
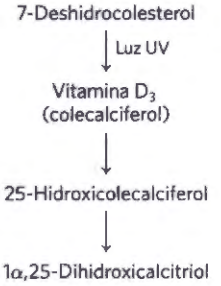


FIGURA 23-5 Modificación proteolítica del precursor de la proopiomelanocortina (POMC). El producto génico inicial de la POMC es un polipéptido largo que experimenta rotura por una serie de proteasas específicas que producen ACTH (corticotropina), β- y γ-lipotropina, α-, β- y γ-MSH (hormona estimulante de los melanocitos o melanocortina), CLIP (péptido intermediario semejante a la corticotropina), β-endorfina y Met-encefalina. Los puntos de corte son dobletes de residuos básicos, Arg-Lys, Lys-Arg o Lys-Lys.

Todas las hormonas esteroides actúan a través de receptores nucleares para cambiar el nivel de expresión de genes específicos (véase la Fig. 12-30). También pueden tener efectos más rápidos facilitados por receptores localizados de la membrana plasmática. Los humanos y otros animales están expuestos a muchas sustancias químicas exógenas denominadas de forma amplia "interruptores endocrinos", que van desde contaminantes ambientales tales como los PBC (bifenilos policlorinados), pesticidas y medicamentos hasta estrógenos presentes de forma natural en plantas, tales como algunos productos de la soja. Algunos interruptores endocrinos se unen a receptores nucleares de esteroides y estimulan efectos de tipo hormonal; otros bloquean los receptores, impidiendo la estimulación por hormonas endógenas o interfieren con el metabolismo normal de las hormonas esteroides en el hígado.

Hormona vitamina D El **calcitriol** (1,25-dihidroxicalcitriol) se obtiene a partir de la vitamina D por reacciones de hidroxilación enzimáticas en el hígado y los riñones (véase la Fig. 10-19a). La vitamina D se obtiene de la dieta o por fotólisis del 7-deshidrocolesterol en la piel expuesta a la luz solar.



El calcitriol actúa de forma concertada con la hormona paratiroidea en la homeostasis del Ca^{2+}, regulando la concentración de Ca^{2+} en la sangre y el equilibrio entre deposición y movilización de Ca^{2+} en el hueso. A través de receptores nucleares, el calcitriol activa la síntesis de una proteína intestinal de unión de calcio, esencial para la asimilación del Ca^{2+} de la dieta. La ingesta insuficiente de vitamina D o defectos en la biosíntesis de calcitriol producen enfermedades graves tales como el raquitismo, en la que los huesos son débiles y están mal formados (véase la Fig. 10-19b). ■

Hormonas retinoides Las **hormonas retinoides** son hormonas potentes que regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular mediante los receptores nucleares de los retinoides. La prohormona retinol se sintetiza principalmente en el hígado a partir del β-caroteno (véase la Fig. 10-20), y muchos tejidos convierten el retinol en la hormona ácido retinoico (RA). El RA se une a su receptor específico (RAR) en el núcleo, forma un dímero con otra proteína nuclear, receptor X retinoide (RXR) y altera la velocidad de expresión de los genes que responden al RA.

β-Caroteno
↓
Vitamina A_1 (retinol)
↓
Ácido retinoico

Los retinoides actúan sobre todos los tejidos, pues todos los tipos de células tienen al menos una forma de receptor nuclear de los retinoides. En los adultos, la córnea, la piel, los epitelios del pulmón y de la tráquea y el sistema inmunitario se encuentran entre las dianas principales; todas ellas experimentan una renovación constante de células. El RA regula la síntesis de proteínas esenciales para el crecimiento y la diferenciación. Un exceso de vitamina A (precursor de las hormonas retinoides) puede producir malformaciones congénitas por lo que se recomienda a las mujeres embarazadas que no utilicen las cremas a base de retinoides desarrolladas para el tratamiento del acné severo. ■

Hormonas tiroideas Las hormonas tiroideas T_4 (tiroxina) y T_3 (triyodotironina) se sintetizan a partir de la proteína precursora tiroglobulina (M_r 660.000). Hasta 20 residuos Tyr de la tiroglobulina se yodan enzimáticamente en la glándula tiroides. A continuación se condensan dos residuos yodotirosina para formar el precursor de la tiroxina. Cuando se necesita la tiroxina se libera por proteólisis. La condensación de monoyodotirosina con diyodotirosina produce T_3, que también es una hormona activa liberada por proteólisis.

Tiroglobulina-Tyr
↓
Tiroglobulina-Tyr-I (residuos Tyr yodados)
↓ proteólisis
Tiroxina (T_4), triyodotironina (T_3)

Las hormonas tiroideas actúan a través de receptores nucleares que estimulan el metabolismo energético, especialmente en el hígado y el músculo, a través del incremento de la expresión de genes que codifican enzimas clave del catabolismo. Una producción disminuida de tiroxina enlentece el metabolismo y puede causar depresión. Cuando la producción disminuida es resultado de escasez de yodo, la glándula tiroides se hipertrofia en un intento fallido de producir más tiroxina **(Fig. 23-6)**

Óxido Nítrico ($NO^{\bullet}$) El **óxido nítrico** es un radical libre relativamente estable que se sintetiza a partir de oxígeno molecular y del nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina (véase la Fig. 22-31) en una reacción catalizada por la **NO sintasa.**

$$\text{Arginina} + 1\tfrac{1}{2}\ \text{NADPH} + 2O_2 \longrightarrow NO^{\bullet} + \text{citrulina} + 2H_2O + 1\tfrac{1}{2}\ NADP^+$$

Este enzima se encuentra en muchos tejidos y tipos celulares: neuronas, macrófagos, hepatocitos, miocitos del músculo liso, células endoteliales de los vasos sanguíneos y células epiteliales del riñón. El NO actúa cerca de su lugar de liberación; penetra en la célula diana y activa el enzima citosólico guanilil ciclasa, que cataliza la formación del segundo mensajero cGMP (véase la Fig. 12-23). Una proteína quinasa dependiente de cGMP interviene en los efectos del NO al fosforilar proteínas clave y alterar su actividad. Por ejemplo, la fosforilación de las proteínas del músculo liso que

Copy-STATION



FIGURA 23-6 Bocio. Persona con bocio avanzado. El bocio es un agrandamiento de la glándula tiroides que puede ocurrir en un intento inútil de producir hormona tiroidea en ausencia de yodo. La sal yodada en la dieta previene el desarrollo de la mayoría de bocios, excepto en los raros casos de defecto genético. Online Mendelian Inheritance in Man (omim.org) un catálogo online de enfermedades genéticas humanas, documenta una serie de condiciones genéticas entre las que se incluyen mutaciones en el gen de la tiroglobulina que puede causar el desarrollo de bocio. [Fuente: Biophoto Associates/Science Source.]

rodean los vasos sanguíneos relaja el músculo con lo que disminuye la presión sanguínea.

La liberación de hormonas está regulada por señales neuronales y hormonales jerarquizadas "de arriba a abajo"

Los niveles variables de hormonas específicas regulan procesos celulares específicos, pero ¿qué regula el nivel de cada hormona? Una respuesta breve es que el sistema nervioso central recibe señales de muchos sensores internos y externos (señales de peligro, hambre, ingesta alimenticia, composición y presión de la sangre, por ejemplo) y orquesta la producción de señales hormonales apropiadas por los tejidos endocrinos. Para una respuesta más completa, es necesario considerar los sistemas de producción de hormonas del cuerpo humano y algunas de sus interacciones funcionales.

La **Figura 23-7** muestra la localización anatómica de las principales glándulas endocrinas de los humanos, y la **Figura 23-8** representa el "escalafón" de la jerarquía de señalización hormonal. El **hipotálamo,** una pequeña región del cerebro **(Fig. 23-9)**, es el centro de coordinación del sistema endocrino; recibe e integra mensajes procedentes del sistema nervioso central. En respuesta a estos mensajes, el hipotálamo produce hormonas reguladoras (factores de liberación) que pasan directamente a la glándula hipófisis vecina a través de vasos sanguíneos y neuronas especiales que conectan las dos glándulas (Fig. 23-9b). La hipófisis tiene dos partes funcionalmente distintas. La **hipófisis posterior** contiene los extremos de los axones de muchas neuronas que se originan en el hipotálamo. Estas neuronas producen los pequeños péptidos con función hormonal oxitocina y vasopresina **(Fig. 23-10)**, que se desplazan por el axón hasta los extremos de los terminales nerviosos en la hipófisis, en donde se almacenan en gránulos de secreción en espera de la señal para su liberación.

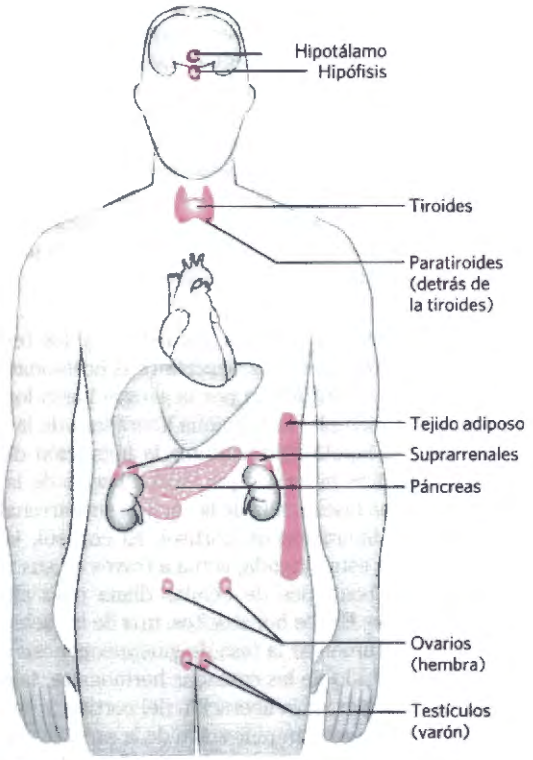


FIGURA 23-7 Principales glándulas endocrinas. Las glándulas están sombreadas en rosa.

La **hipófisis anterior** responde a las hormonas hipotalámicas transportadas por la sangre produciendo **hormonas trópicas** o **tropinas** (del griego *tropos*, que significa "vuelta"). Estos polipéptidos relativamente largos activan el siguiente nivel de glándulas endocrinas (Fig. 23-8), entre las que se encuentran la corteza supra-

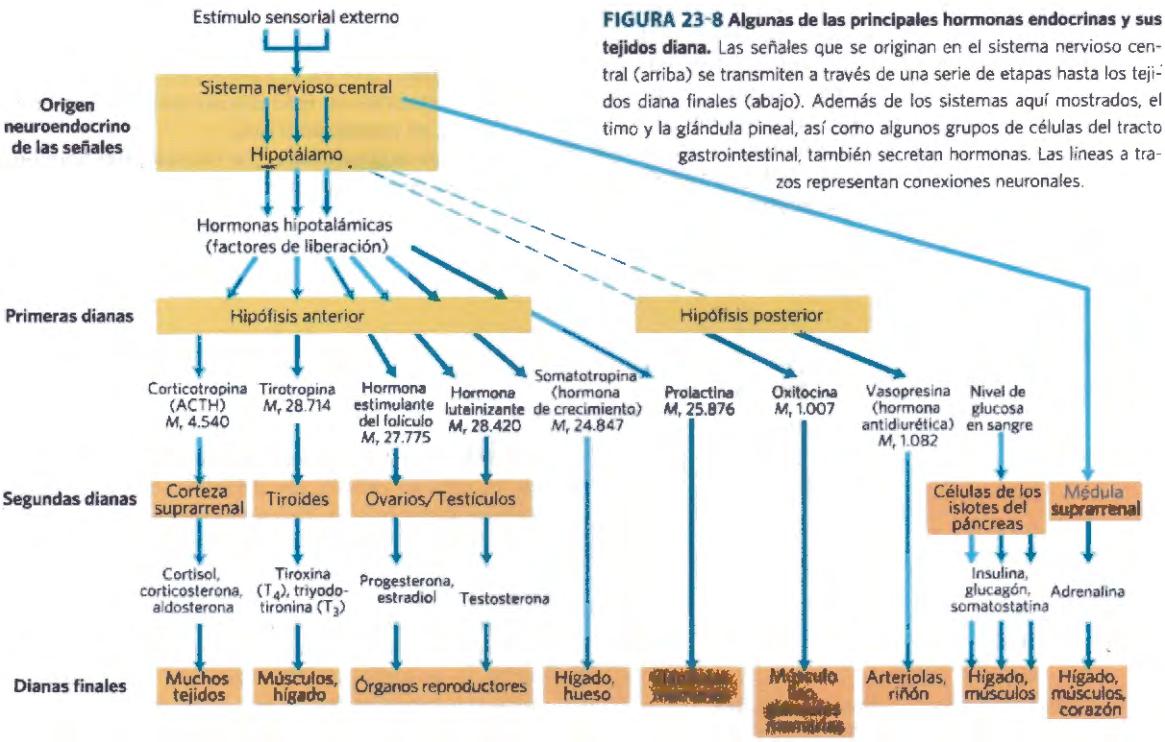


FIGURA 23-8 Algunas de las principales hormonas endocrinas y sus tejidos diana. Las señales que se originan en el sistema nervioso central (arriba) se transmiten a través de una serie de etapas hasta los tejidos diana finales (abajo). Además de los sistemas aquí mostrados, el timo y la glándula pineal, así como algunos grupos de células del tracto gastrointestinal, también secretan hormonas. Las líneas a trazos representan conexiones neuronales.

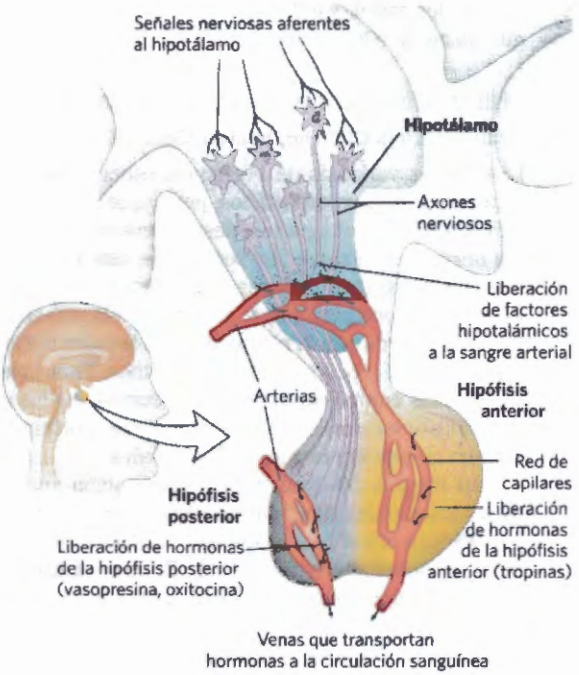


FIGURA 23-9 Orígenes neuroendocrinos de las señales hormonales. Localización del hipotálamo y la hipófisis y detalles del sistema hipotálamo-hipófisis. Señales de neuronas conectoras estimulan la secreción de factores de liberación por el hipotálamo en un vaso sanguíneo, que los transporta directamente a una red de capilares en la hipófisis anterior. En respuesta a cada factor de liberación, la hipófisis anterior libera la hormona apropiada a la circulación sanguínea general. Las hormonas de la hipófisis posterior se sintetizan en neuronas que parten del hipotálamo y son transportadas a través de axones hasta las terminaciones nerviosas situadas en la hipófisis posterior y allí se almacenan hasta su liberación a la sangre en respuesta a una señal neuronal.

rrenal, la glándula tiroides, los ovarios y los testículos. Estas glándulas, a su vez, secretan sus hormonas específicas, que se transportan por la sangre hasta los tejidos diana. Por ejemplo, la hormona liberadora de la corticotropina del hipotálamo estimula la liberación de ACTH por la hipófisis anterior, que llega a través de la sangre hasta la zona fasciculada de la corteza suprarrenal donde provoca la liberación de cortisol. El cortisol, la última hormona de esta cascada, actúa a través de sus receptores en muchos tipos de células diana para alterar su metabolismo. En los hepatocitos, una de las acciones del cortisol es aumentar la tasa de gluconeogénesis.

El resultado de las cascadas hormonales, tales como las responsables de la liberación del cortisol y de la adrenalina, es una gran amplificación de la señal inicial, lo que permite la modulación precisa de la producción de la hormona final **(Fig. 23-11)**. A cada nivel de la cascada, una pequeña señal provoca una respuesta mayor. Por ejemplo, la señal eléctrica inicial sobre el hipotálamo provoca la liberación de unos pocos *nanogramos* de hormona liberadora de la corticotropina, que estimula la liberación de unos pocos *microgramos* de corticotropina. La corticotropina actúa sobre la corteza suprarrenal dando lugar a la liberación de *miligramos* de cortisol, con una amplificación global de al menos un millón de veces.

A cada nivel de la cascada hormonal cabe la posibilidad de retroinhibición sobre etapas anteriores de la cascada; un nivel innecesariamente elevado de la hormona final o de una de las hormonas intermedias inhibe la liberación de las hormonas anteriores de la cascada. Estos mecanismos de retroalimentación cumplen la misma finalidad que los que limitan la producción de una vía biosintética: (compare la Fig. 23-11 con la Fig. 22-37): un producto sólo se sintetiza (o libera) hasta que alcanza la concentración necesaria.

Sistemas hormonales "de abajo a arriba" envían señales de nuevo al cerebro y a otros tejidos

Además de la jerarquía de arriba a abajo de las señales hormonales mostrada en la Figura 23-8, algunas hormonas se producen en el tracto digestivo, músculo y tejido adiposo y comunican el estado metabólico del momento al hipotálamo **(Fig. 23-12)**. Estas señales se integran en el hipotálamo y aparece una respuesta neuronal u hormonal adecuada. La acción del enzima proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el hipotálamo es uno de tales mecanismos integradores; suma diversas señales y pasa la información mediante la fosforilación de proteínas clave en el hipotálamo. Las señales hormonales conocidas en este mecanismo son numerosas y, sin duda, se descubrirán más.

Las **adipoquinas**, por ejemplo, son hormonas peptídicas, producidas en el tejido adiposo, que indican si las

CopyStation

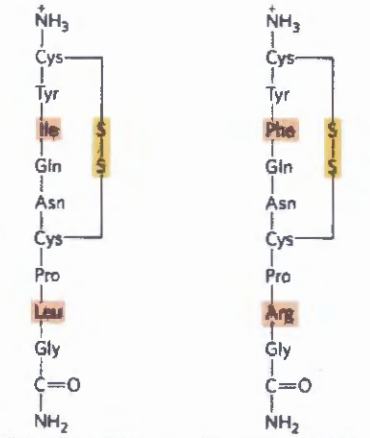


FIGURA 23-10 Dos hormonas de la hipófisis posterior. Los residuos de los extremos carboxilo son glicinamida, $-NH-CH_2-CONH_2$ (tal como se observó en la Fig. 23-2, la amidación del extremo carboxilo es común en las hormonas peptídicas cortas). Estas dos hormonas, idénticas en todos los residuos excepto dos (sombreados en rosa), tienen efectos fisiológicos muy distintos. La oxitocina actúa sobre los músculos lisos del útero y de la glándula mamaria, provocando contracciones uterinas durante el parto y promoviendo la secreción láctea durante la lactación. La vasopresina (también denominada hormona antidiurética) aumenta la reabsorción del agua en el riñón y provoca la contracción de los vasos sanguíneos, aumentando así la presión sanguínea.

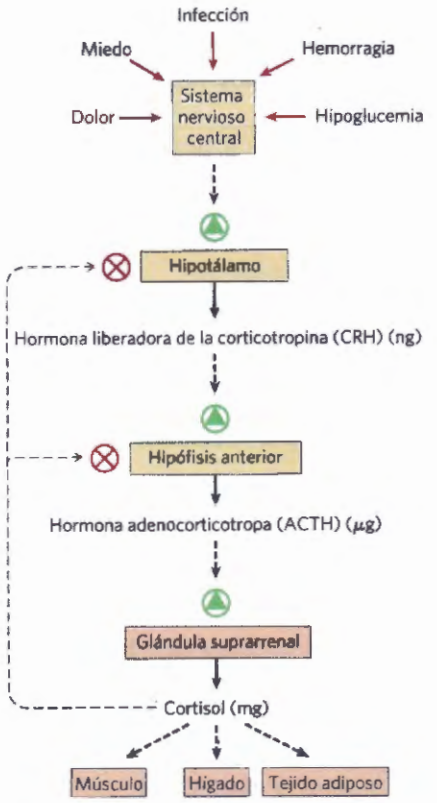


FIGURA 23-11 Cascada de liberación de hormonas inducida por la estimulación del hipotálamo por el sistema nervioso central. Las flechas negras continuas indican la producción y liberación de hormona y las flechas negras a trazos indican la acción de la hormona en el tejido diana. En cada tejido endocrino de la ruta, un estímulo procedente de un nivel superior, es recibido amplificado y transducido en la liberación de la siguiente hormona de la cascada. La cascada puede ser regulada a diferentes niveles por retroinhibición (flechas finas a trazos) por la hormona final (en este caso, cortisol). Por tanto, el producto controla su propia producción, como en las vías biosintéticas de las células individuales.

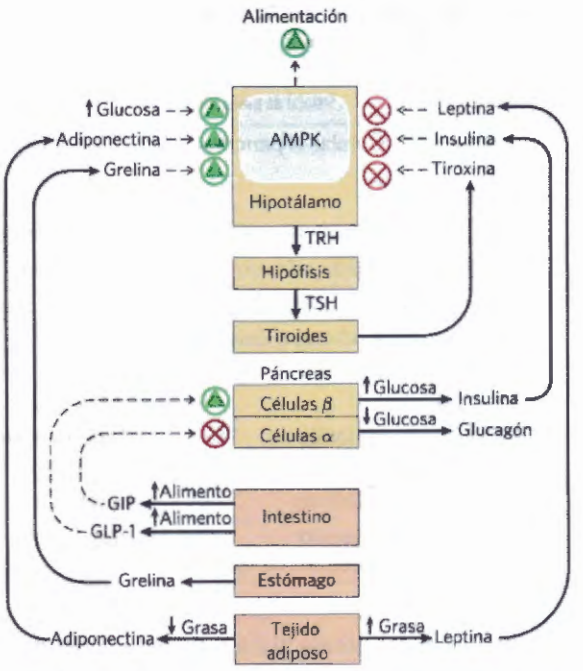


FIGURA 23-12 Regulación del comportamiento alimentario por el flujo de información en dos sentidos entre tejidos y el hipotálamo. Cuando la ingestión de alimento y la producción de energía son los adecuados, las hormonas peptídicas liberadas por el estómago, intestino y tejido adiposo retroalimentan el hipotálamo indicando saciedad y reducir la alimentación. Otras hormonas peptídicas específicas de tejidos señalan suministros inadecuados de almacenamiento de triacilgliceroles o niveles bajos de glucosa en sangre. Todas estas señales inciden directa o indirectamente sobre la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el hipotálamo, el cual integra estas señales e influye sobre el comportamiento alimentario y el metabolismo productor de energía en los tejidos. Los nervios transportan señales eléctricas desde el cerebro a los demás tejidos para completar el circuito de información y conseguir la homeostasis (no mostrado). TRH, hormona liberadora de tirotropina; GLP-1, péptido-1 tipo glucagón; GIP, polipéptido inhibidor gástrico.

reservas grasas son adecuadas. La **leptina**, liberada cuando el tejido adiposo está relleno de triacilgliceroles, actúa en el cerebro para inhibir el comportamiento alimentario, mientras que la **adiponectina** señala el agotamiento de las reservas de grasa y estimula la alimentación. La **grelina** se produce en el tracto gastrointestinal cuando el estómago está vacío y actúa sobre el hipotálamo para estimular el comportamiento alimentario; cuando se llena el estómago, cesa la liberación de grelina. Las **incretinas** son hormonas peptídicas producidas en el intestino después de la ingestión de una comida; aumentan la secreción de insulina y disminuyen la secreción de glucagón en el páncreas. Las incretinas mejor estudiadas son el **péptido tipo glucagón 1 (GLP-1)** y el **polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP)**, también conocido como **polipéptido inhibidor gástrico**.

El **neuropéptido Y (NPY)** es una hormona producida en el sistema nervioso central (hipotálamo) y en las glándulas suprarrenales. Su liberación promueve la ingesta y reduce el gasto energético en actividades no esenciales. El **péptido YY (PYY_{3-36})**, producido en el intestino, indica saciedad. NPY y PYY_{3-36} actúan a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR; véase el Capítulo 12).

Las **irisina** es una hormona peptídica producida en el músculo en respuesta al ejercicio; actúa convirtiendo tejido adiposo blanco en tejido adiposo marrón o beige, los cuales disipan la energía en forma de calor (véase la Sección 23.2).

Se ha demostrado que todas esta hormonas, y más, funcionan en ratas y ratones utilizados en estudios experimentales sobre comportamiento alimentario y obesidad, y también en humanos (Tabla 23-2). Volveremos a estas hormonas cuando discutamos la regulación del peso corporal en humanos (Sección 23.4).

RESUMEN 23.1 Hormonas: Estructuras diversas para funciones diversas

- Las hormonas son mensajeros químicos segregados en la sangre o en el fluido intersticial por determinados tejidos para regular la actividad de otras células o tejidos.
- El radioinmunoensayo y el ELISA son dos técnicas de gran sensibilidad para detectar y cuantificar hormonas.
- Las hormonas peptídicas, catecolaminas e icosanoides se unen a receptores específicos de la membrana

TABLA 23-2 Algunas hormonas peptídicas que actúan sobre el comportamiento alimentario y en la selección de combustible en mamíferos

Hormona	Sitio(s) de producción	Tejido(s) diana	Acción(es)
Insulina	Células β pancreáticas	Músculo, adiposo, hígado	Estimula la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno y grasa
Glucagón	Células α pancreáticas	Hígado, adiposo	Estimula la gluconeogénesis y la liberación de glucosa a la sangre
Leptina	Tejido adiposo	Hipotálamo	Reduce el apetito
Adiponectina	Tejido adiposo	Músculo, hígado, otros	Estimula el catabolismo
Grelina	Estómago, intestino	Cerebro	Señala apetito
Incretinas: GLP-1, GIP	Intestino	Páncreas	Estimula la liberación de insulina
NPY	Hipotálamo, suprarrenales	Cerebro, sistema nervioso autónomo	Estimula el comportamiento alimentario
PYY_{3-36}	Intestino	Cerebro	Señala saciedad
Irisina	Músculo (después de ejercicio)	Adiposo	Cambia el tejido adiposo blanco en beige

plasmática de las células diana y alteran el nivel de un segundo mensajero intracelular sin entrar en el interior de la célula.

- Las hormonas esteroideas, la vitamina D, los retinoides y las hormonas tiroideas penetran en el interior de las células diana y alteran la expresión génica al interaccionar con receptores nucleares específicos.
- Las cascadas hormonales, en las que catalizadores activan otros catalizadores, amplifican un estímulo inicial en varios órdenes de magnitud, frecuentemente en un tiempo muy corto (segundos).
- Algunas hormonas se sintetizan en forma de prohormonas y se activan por rotura enzimática. En algunos casos, tales como la insulina, se produce una hormona mediante cortes proteolíticos; en otros, como por ejemplo POMC, el corte de una única prohormona da lugar a varias hormonas distintas.
- Las hormonas están reguladas por unas interacciones jerarquizadas de arriba a abajo entre el cerebro y las glándulas endocrinas: impulsos nerviosos estimulan el hipotálamo para que envíe hormonas específicas a la hipófisis, que estimulan (o inhiben) así la liberación de hormonas trópicas. Las hormonas de la hipófisis anterior estimulan a su vez otras glándulas endocrinas (tiroides, suprarrenales, páncreas) para que secreten sus hormonas características que, a su vez, estimulan tejidos diana específicos.
- Las hormonas peptídicas también actúan en una señalización de abajo a arriba: tejido adiposo, músculo y tracto gastrointestinal liberan hormonas peptídicas que actúan sobre otros tejidos o sobre el sistema nervioso central.

23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo

Cada tejido del cuerpo humano tiene una función especializada, que se manifiesta en su anatomía y en su actividad metabólica **(Fig. 23-13)**. El músculo esquelético permite el movimiento dirigido; el tejido adiposo almacena y libera energía en forma de grasas, que se utilizan como combustible en todo el cuerpo; en el cerebro las células bombean iones a través de las membranas plasmáticas para producir señales eléctricas. El hígado tiene un papel central de transformación y distribución en el metabolismo y proporciona a todos los demás órganos y tejidos una mezcla adecuada de nutrientes a través del torrente circulatorio. La centralidad funcional del hígado se pone de relieve en el hecho que todos los otros órganos y tejidos se designen comúnmente como "extrahepáticos". Empezaremos, pues, nuestra discusión sobre la división del trabajo metabólico estudiando la transformación de los glúcidos, los aminoácidos y las grasas en el hígado de los mamíferos. A continuación describiremos brevemente las principales funciones metabólicas del tejido adiposo, músculo, cerebro y del medio que interconecta todos los demás: la sangre.

El hígado transforma y distribuye los nutrientes

Durante la digestión en los mamíferos, los tres principales tipos de nutrientes (glúcidos, proteínas y lípidos) experimentan hidrólisis enzimática hasta convertirse en sus constituyentes sencillos. Esta degradación es necesaria, puesto que las células epiteliales que revisten la luz intestinal sólo son capaces de absorber moléculas relativamente pequeñas. Muchos de los ácidos grasos y monoacilgliceroles liberados en el intestino tras la digestión de las grasas se convierten de nuevo en triacilgliceroles (TAG) en el interior de estas células epiteliales.

Después de ser absorbidos, la mayor parte de los azúcares y aminoácidos y algunos TAG reconstituidos pasan a los capilares de la sangre desde las células epiteliales del intestino y viajan por el torrente circulatorio hasta el hígado; el resto de TAG entran en el tejido adiposo a través del sistema linfático. La vena porta (Fig. 23-13) es una ruta directa desde los órganos digestivos al hígado por lo que el hígado es el primero en tener acceso a los nutrientes ingeridos. El hígado tiene dos tipos principales de células. Las células de Kupffer son fagocitos, importantes en la función inmunitaria. Los

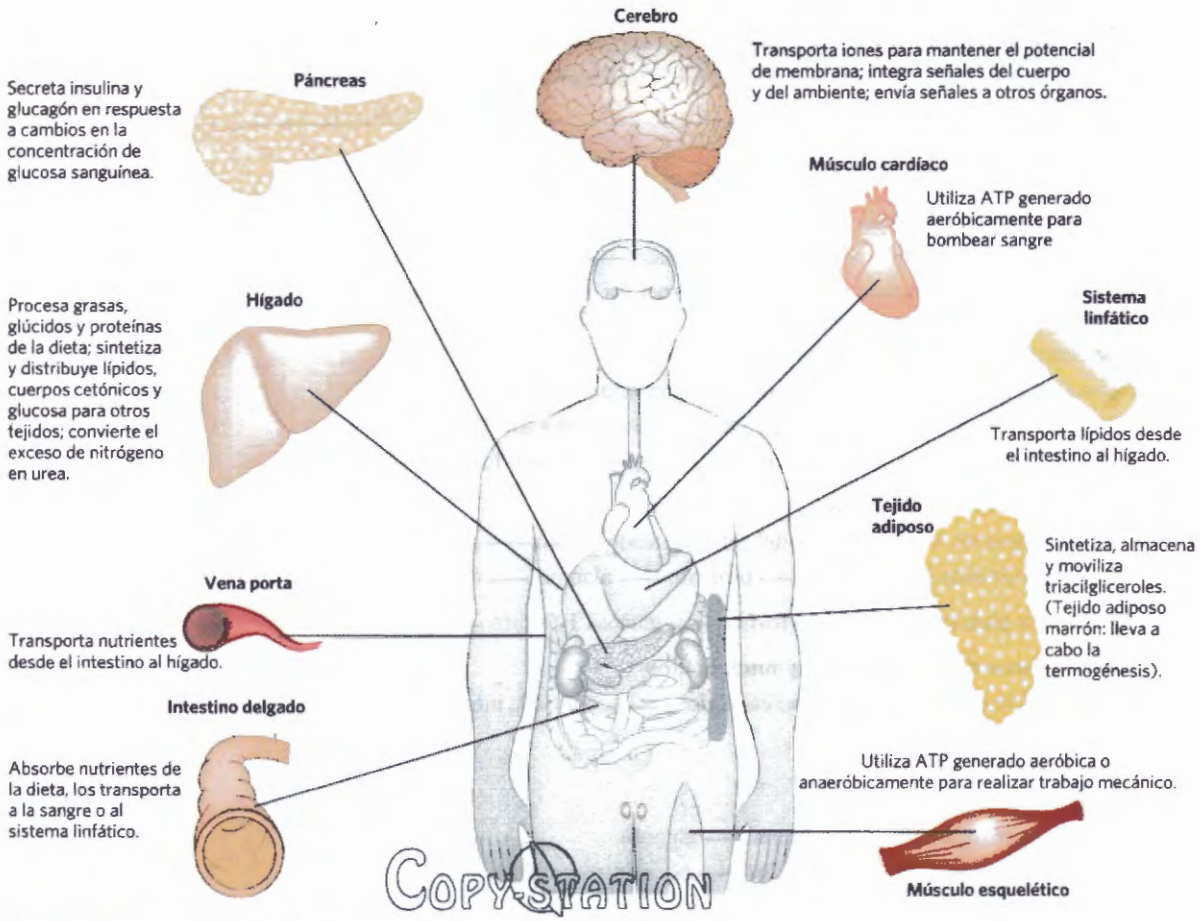


FIGURA 23-13 **Funciones metabólicas especializadas de los tejidos de los mamíferos.**

hepatocitos, de interés primordial aquí, transforman los nutrientes obtenidos de la dieta en los combustibles y precursores necesarios para cada tejido y los exportan a través de la sangre. Los tipos y cantidades de nutrientes suministrados por el hígado vienen determinados por el tipo de dieta, el intervalo de tiempo entre comidas otros factores. La demanda de combustibles y precursores de los tejidos extrahepáticos varía según el órgano, el nivel de actividad y el estado nutricional global del individuo.

El hígado tiene una notable flexibilidad metabólica para responder a estas circunstancias cambiantes. Por ejemplo, cuando la dieta es rica en proteínas, los hepatocitos contienen niveles elevados de enzimas para el catabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis. Al cambiar a una dieta rica en glúcidos, los niveles de estos enzimas caen en pocas horas y empiezan a sintetizarse los enzimas necesarios para el metabolismo de los glúcidos y la síntesis de grasas. Los enzimas hepáticos se recambian (se sintetizan y degradan) a una velocidad cinco a diez veces superior a la velocidad de recambio de los enzimas en otros tejidos tales como el músculo. Los tejidos extrahepáticos también pueden ajustar su metabolismo a las condiciones imperantes, pero ninguno de estos tejidos es tan adaptable como el hígado, ni tiene un papel tan central en las actividades metabólicas generales del organismo. A continuación se examinan los posibles destinos de los azúcares, aminoácidos y lípidos que entran en el hígado desde el torrente circulatorio. Para ayudar a recordar las transformaciones metabólicas implicadas, la Tabla 23-3 muestra las rutas y procesos principales que examinaremos, con mención de la figura (en capítulos anteriores) en la que se muestra el detalle de cada ruta. A continuación resumimos las rutas que hacen referencia a las rutas y reacciones destacadas en las Figuras 23-14 a 23-16.

Azúcares El transportador de glucosa de los hepatocitos (GLUT2) permite una difusión pasiva y rápida de la glucosa de modo que la concentración de glucosa en el interior de un hepatocito es esencialmente igual a la de la sangre. La glucosa que entra en los hepatocitos es fosforilada por la glucoquinasa (hexoquinasa IV) para dar glucosa 6-fosfato. La glucoquinasa tiene una K_m para la glucosa (10 mM) mucho más alta que los isozimas de la hexoquinasa en otras células (pp. 590-591); a diferencia de estos otros isozimas, no es inhibida por su producto, la glucosa 6-fosfato. La presencia de glucoquinasa permite que los hepatocitos continúen fosforilando glucosa cuando su concentración alcanza niveles muy por encima de aquellos que resultarían saturantes para las demás hexoquinasas. La elevada K_m de la glucoquinasa también asegura que la fosforilación de la glucosa en los hepatocitos sea mínima cuando la concentración de glucosa es baja, impidiendo así que el hígado consuma glucosa como combustible a través de la glucólisis.

TABLA 23-3 Rutas metabólicas de los glúcidos, aminoácidos y grasas mostradas en capítulos anteriores

Vía Referencia a la(s)	Figura(s)
Ciclo del ácido cítrico: acetil-CoA ⟶ $2CO_2$	16-7
Fosforilación oxidativa: síntesis de ATP	19-19
Catabolismo de glúcidos	
Glucogenólisis: glucógeno ⟶ glucosa 1-fosfato ⟶ glucosa sanguínea	15-27; 15-28
Incorporación de hexosas a la glucólisis: fructosa, manosa, galactosa ⟶ glucosa 6-fosfato	14-11
Glucólisis: glucosa ⟶ piruvato	14-2
Reacción de la piruvato deshidrogenasa: piruvato ⟶ acetil-CoA	16-2
Fermentación del ácido láctico: glucógeno ⟶ lactato + 2ATP	14-4
Ruta de las pentosas fosfato: glucosa 6-fosfato ⟶ pentosas fosfato + NADPH	14-22
Anabolismo de los glúcidos	
Gluconeogénesis: intermediarios del ciclo del ácido cítrico ⟶ glucosa	14-17
Ciclo glucosa-alanina: glucosa ⟶ piruvato ⟶ alanina ⟶ glucosa	18-9
Síntesis de glucógeno: glucosa 6-fosfato ⟶ glucosa 1-fosfato ⟶ glucógeno	15-32
Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos	
Degradación de aminoácidos: aminoácidos ⟶ acetil-CoA, intermediarios del ciclo del ácido cítrico	18-15
Síntesis de aminoácidos	22-11
Ciclo de la urea: NH_3 ⟶ urea	18-10
Ciclo de la glucosa-alanina: alanina ⟶ glucosa	18-9
Síntesis de nucleótidos: aminoácidos ⟶ purinas, pirimidinas	22-35; 22-38
Síntesis de hormonas y neurotransmisores	22-31
Catabolismo de las grasas	
β-Oxidación de los ácidos grasos: ácido graso ⟶ acetil-CoA	17-8
Oxidación de cuerpos cetónicos: β-hidroxibutirato ⟶ acetil-CoA ⟶ CO_2 del ciclo del ácido cítrico	17-19
Anabolismo de las grasas	
Síntesis de ácidos grasos: acetil-CoA ⟶ ácidos grasos	21-6
Síntesis de triacilgliceroles: acetil-CoA ⟶ ácidos grasos ⟶ triacilglicerol	21-17 a 21-19
Formación de cuerpos cetónicos: acetil-CoA ⟶ acetoacetato, β-hidroxibutirato	17-18
Síntesis de colesterol y de sus ésteres: acetil-CoA ⟶ colesterol ⟶ ésteres de colesterol	21-33 a 21-38
Síntesis de fosfolípidos: ácidos grasos ⟶ fosfolípidos	21-17; 21-23 a 21-28

COPY-STATION

Ello contribuye al ahorro de glucosa, que puede destinarse a otros tejidos. La fructosa, la galactosa y la manosa absorbidas en el intestino delgado también se convierten en glucosa 6-fosfato a través de las rutas enzimáticas examinadas en el Capítulo 14. La glucosa 6-fosfato se halla en la encrucijada del metabolismo de los glúcidos en el hígado. Puede optar entre varias rutas metabólicas principales **(Fig. 23-14)**, según las necesidades metabólicas del organismo. El flujo de glucosa es dirigido en el hígado hacia una o más de estas rutas por la actividad de varios enzimas regulados alostéricamente y por la regulación hormonal de la síntesis y actividad enzimáticas.

❶ La glucosa 6-fosfato es desfosforilada por la glucosa 6-fosfatasa para dar glucosa libre (véase la Fig. 15-30), que se exporta para mantener los niveles de glucosa en sangre. La exportación es la vía predominante cuando la cantidad de glucosa 6-fosfato es limitada, puesto que la concentración de glucosa en sangre debe mantenerse suficientemente alta (4 a 5 mM) para proporcionar la energía adecuada al cerebro y demás tejidos. ❷ La glucosa 6-fosfato que no es necesaria de modo inmediato para formar glucosa sanguínea se transforma en glucógeno hepático o tiene algún otro destino. Después de la glucólisis y la reacción de la piruvato deshidrogenasa, ❸ el acetil-CoA así formado puede oxidarse para la producción de ATP en el ciclo del ácido cítrico; la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa consiguientes proporcionan ATP. (Sin embargo, normalmente los ácidos grasos son el combustible preferido para la producción de energía en los hepatocitos.) ❹ El acetil-CoA, también puede servir

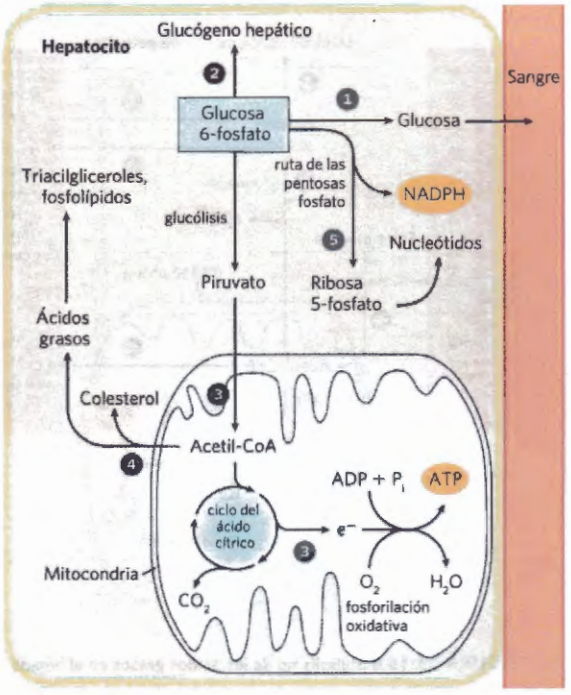


FIGURA 23-14 Rutas metabólicas de la glucosa 6-fosfato en el hígado. En ésta y en las figuras 23-15 y 23-16, las rutas anabólicas se indican generalmente dirigidas hacia arriba, las rutas catabólicas hacia abajo y la distribución hacia otros órganos horizontalmente. Los procesos numerados en cada figura se describen en el texto.

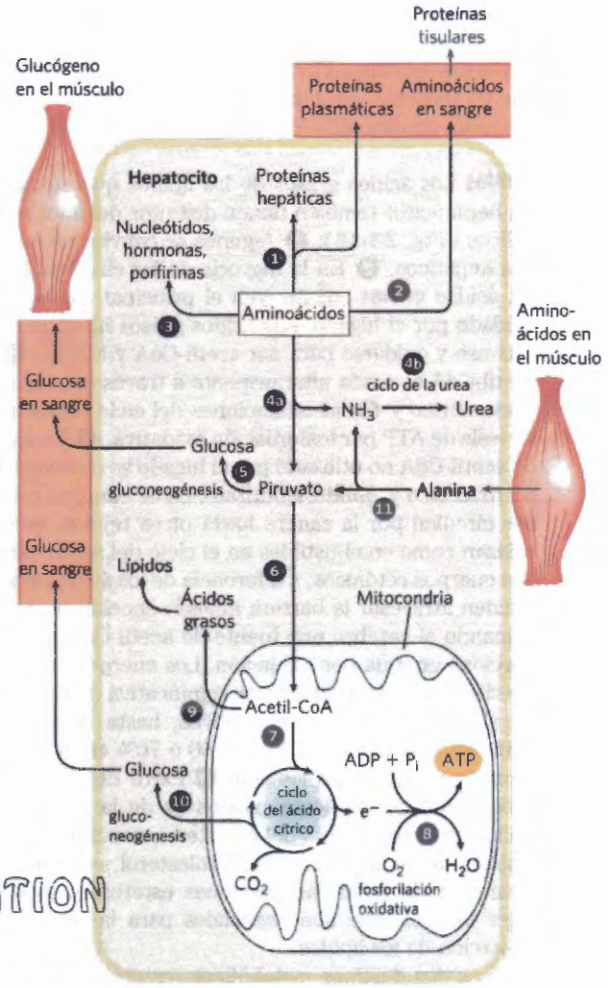


FIGURA 23-15 Metabolismo de los aminoácidos en el hígado.

COPY STATION

de precursor para la síntesis de ácidos grasos, que son incorporados en los TAG, fosfolípidos, y colesterol. Una buena parte de los lípidos que se sintetizan en el hígado se transportan a otros tejidos por lipoproteínas plasmáticas. ❺ Alternativamente, la glucosa 6-fosfato puede entrar en la vía de las pentosas fosfato, que proporciona el poder reductor (NADPH), necesario para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, y D-ribosa 5-fosfato, un precursor en la biosíntesis de los nucleótidos. El NADPH es también un cofactor esencial en la destoxificación y eliminación de muchos medicamentos y otros xenobióticos metabolizados en el hígado.

Aminoácidos Los aminoácidos que entran en el hígado pueden tomar diferentes rutas metabólicas importantes **(Fig. 23-15)**. ❶ Actúan como precursores para la síntesis de proteínas, proceso contemplado en el Capítulo 27. El hígado renueva constantemente sus propias proteínas, que tienen una velocidad de recambio relativamente elevada (vida media promedio de unas pocas horas a unos pocos días), y es también el sitio de la biosíntesis de la mayor parte de las proteínas plasmáticas. ❷ Alternativamente, los aminoácidos pueden pasar a otros órganos a través de la sangre para ser utilizados como precursores en la síntesis de proteínas tisulares. ❸ Otros aminoácidos son precursores en la biosíntesis de nucleótidos, hormonas y otros compuestos nitrogenados, en el hígado y otros tejidos.

❹a Los aminoácidos que no son necesarios como precursores biosintéticos se transaminan o desaminan y se degradan para proporcionar piruvato e intermedios del ciclo del ácido cítrico que siguen diversos destinos; ❹b el amoníaco liberado se convierte en el producto de excreción urea. ❺ El piruvato puede convertirse en glucosa y glucógeno a través de la gluconeogénesis o ❻ convertirse en acetil-CoA que tiene varios destinos posibles: ❼ puede oxidarse en el ciclo del ácido cítrico y ❽ la fosforilación oxidativa para producir ATP, o ❾ convertirse en lípidos para su almacenamiento. ❿ Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico pueden salir del mismo para la síntesis de glucosa vía gluconeogénesis.

El hígado también metaboliza los aminoácidos que llegan de forma intermitente desde otros tejidos. La sangre recibe un suministro adecuado de glucosa inmediatamente después de la digestión y absorción de los glúcidos de la dieta o bien, entre comidas, por la conversión del glucógeno hepático en glucosa sanguínea. En los intervalos entre comidas, especialmente si son prolongados, una parte de la proteína muscular se degrada a aminoácidos. Estos aminoácidos ceden sus grupos amino (por transaminación) al piruvato, el producto de la glucólisis, para dar alanina, que ⓫ se transporta hasta el hígado y se desamina. Los hepatocitos convierten el piruvato resultante en glucosa sanguínea (por gluconeogénesis ❺) y el amoníaco se transforma en urea para su excreción ❹b. Una ventaja de este ciclo de la

glucosa-alanina (véase la Fig. 18-9) es que se suavizan las fluctuaciones de la glucosa sanguínea en los períodos entre comidas. El déficit de aminoácidos padecido por el músculo se compensa después de la comida siguiente con los aminoácidos de la dieta.

Lípidos Los ácidos grasos de los lípidos que entran en los hepatocitos también tienen distintos destinos metabólicos **(Fig. 23-16)**. ❶ Algunos se convierten en lípidos hepáticos. ❷ En la mayoría de las circunstancias, los ácidos grasos constituyen el principal combustible oxidado por el hígado. Los ácidos grasos libres pueden activase y oxidarse para dar acetil-CoA y NADH. ❸ El acetil-CoA se oxida ulteriormente a través del ciclo del ácido cítrico y ❹ las oxidaciones del ciclo impulsan la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. ❺ El exceso de acetil-CoA no utilizado por el hígado se convierte en, acetoacetato y β-hidroxibutirato; estos cuerpos cetónicos circulan por la sangre hasta otros tejidos, que los utilizan como combustibles en el ciclo del ácido cítrico. Los cuerpos cetónicos, a diferencia de los ácidos grasos, pueden atravesar la barrera hemato-encefálica proporcionando al cerebro una fuente de acetil-CoA que proporciona energía por oxidación. Los cuerpos cetónicos pueden suministrar una parte significativa de la energía en algunos tejidos extrahepáticos, hasta una tercera parte en el corazón, y hasta el 60 o 70% en el cerebro durante el ayuno prolongado. ❻ Parte del acetil-CoA procedente de los ácidos grasos (y de la glucosa) se utiliza en la biosíntesis del colesterol, necesario para la síntesis de las membranas. El colesterol es también el precursor de todas las hormonas esteroides y de las sales biliares, que son esenciales para la digestión y absorción de los lípidos.

Los dos destinos metabólicos restantes de los lípidos precisan mecanismos especializados para el transporte de lípidos insolubles en la sangre. ❼ Los ácidos grasos se transforman en los fosfolípidos y los TAG de las lipoproteínas plasmáticas, que transportan lípidos hasta el tejido adiposo para su almacenamiento. ❽ Algunos ácidos grasos libres se unen a la seroalbúmina y se transportan al corazón y a los músculos esqueléticos, que absorben y oxidan los ácidos grasos libres como combustible principal. La seroalbúmina es la proteína plasmática más abundante; una molécula de seroalbúmina puede transportar hasta 10 moléculas de ácidos grasos libres.

Así pues, el hígado actúa como centro de distribución del organismo, exportando nutrientes en las cantidades necesarias a otros órganos, amortiguando las fluctuaciones metabólicas provocadas por la ingestión intermitente de comida y transformando el exceso de grupos amino en urea y otros productos que serán eliminados por los riñones. Ciertos nutrientes, entre ellos los iones Fe y la vitamina A, se almacenan en el hígado. El hígado también destoxifica compuestos orgánicos extraños, tales como fármacos, aditivos presentes en alimentos, conservantes y otros agentes potencialmente peligrosos y sin valor alimenticio. El proceso de destoxificación implica normalmente una hidroxilación, dependiente del citocromo P-450, de compuestos orgánicos relativamente insolubles para aumentar su solubilidad y facilitar así su ulterior degradación y excreción (véase el Recuadro 21-1).

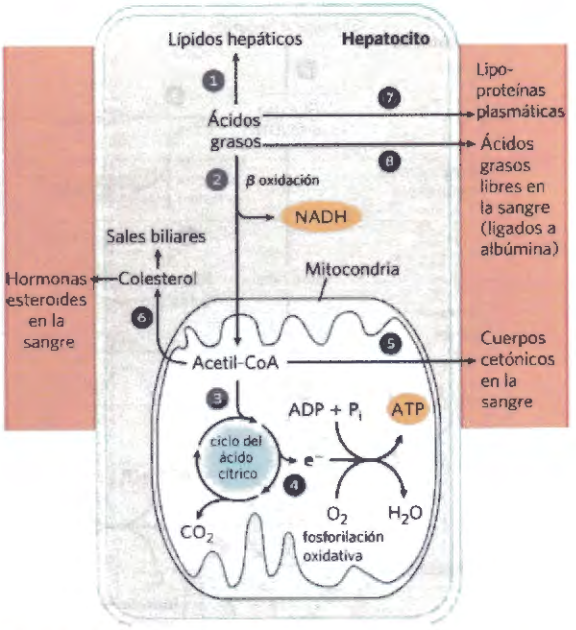


FIGURA 23-16 Metabolismo de los ácidos grasos en el hígado.

El tejido adiposo almacena y suministra ácidos grasos

Hay dos tipos distintos de tejido adiposo, el blanco y el marrón **(Fig. 23-17)**, con funciones diferentes. Describiremos primero el más abundante de los dos. El **tejido adiposo blanco (WAT)** es amorfo y se halla ampliamente distribuido en el cuerpo: bajo la piel, alrededor de los vasos sanguíneos profundos y en la cavidad abdominal. Los **adipocitos** del WAT son células grandes y esféricas (diámetro de 30 a 70 μm), que contienen una única gotícula lipídica grande que constituye un 65% de la masa celular y confina las mitocondrias y el núcleo en una fina capa limitada por la membrana plasmática (Fig. 23-17a, c). La gotícula lipídica contiene TAGy ésteres de esterol y está recubierta con una monocapa de fosfolípidos, orientados con sus grupos de cabeza encarados al citosol. Proteínas específicas, incluídas la perilipina y los enzimas para la síntesis y degradación de TAG, están asociadas con la superficie de las gotículas (véase la Fig. 17-3). El WAT suele representar un 15% de la masa de un hombre adulto joven. Los adipocitos son metabólicamente activos y responden rápidamente a estímulos hormonales en coordinación metabólica con el hígado, músculo esquelético y corazón.

Lo mismo que otros tipos celulares, los adipocitos tienen un metabolismo glucolítico activo, utilizan el ciclo del ácido cítrico para oxidar el piruvato y los ácidos grasos y realizan la fosforilación oxidativa mitocondrial. En períodos de ingestión de glúcidos elevada, el tejido adiposo puede convertir la glucosa (a través de la formación de piruvato y acetil-CoA) en ácidos grasos, convertir los ácidos grasos en TAG y almacenarlos como grandes gotículas de grasa, aunque en los humanos la mayor parte de la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en los hepatocitos. Los adipocitos almacenan TAG, que proceden del hígado (transportados en la sangre en forma de VLDL) y del tracto intestinal (transportados en los quilomicrones), especialmente después de comidas ricas en grasas.

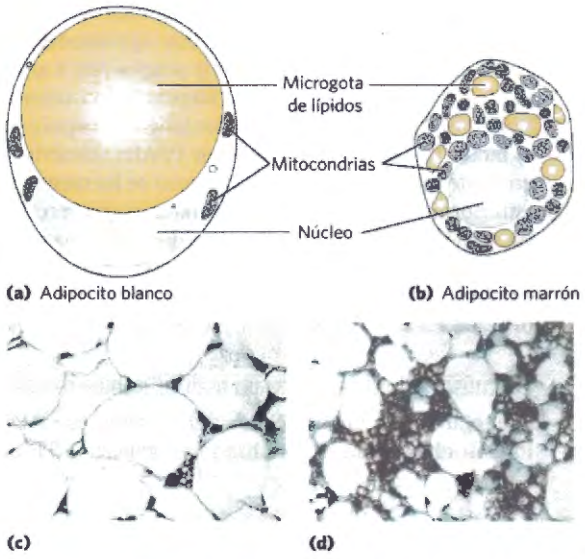


FIGURA 23-17 Adipocitos de los tejidos adiposo blanco y marrón. Esquema de adipocitos típicos de ratón de **(a)** tejido adiposo blanco (WAT) y **(b)** tejido adiposo marrón (BAT). Los adipocitos blancos son mayores y contienen una única gotícula de gran tamaño, que comprime las mitocondrias y el núcleo contra la membrana plasmática. En los adipocitos marrones, las mitocondrias son mucho más abundantes, el núcleo se encuentra cerca del centro de la célula y se observan múltiples microgotas de grasa. Abajo se muestran micrografías ópticas de adipocitos de WAT **(c)** teñidas para mostrar los núcleos, y **(d)** una región con una mezcla de adipocitos blancos y marrones teñidos con un anticuerpo específico para UCP1. [Fuente: (c, d) Cortesía del Dr. Patrick Seale.]

COPY STATION

Cuando aumenta la demanda de combustible (entre comidas, por ejemplo), los TAG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados por lipasas para liberar los ácidos grasos, que pueden ser entonces transferidos, a través del torrente circulatorio, al músculo esquelético y al corazón. La liberación de ácidos grasos por los adipocitos se acelera en gran medida por acción de la adrenalina, que estimula la fosforilación dependiente de cAMP de la perilipina, lo que permite el acceso de las lipasas específicas de tri-, di- y monoacilgliceroles a los TAG de la gotícula de lípido (véase la Fig. 17-3). La lipasa sensible a hormonas también se estimula por fosforilación, pero no es ésta la causa principal del aumento de la lipólisis. La insulina contrarresta este efecto de la adrenalina disminuyendo la actividad de la lipasa.

La degradación y síntesis de TAG en el tejido adiposo constituye un ciclo de sustrato; hasta el 70% de los ácidos grasos liberados por las tres lipasas se reesterifican en los adipositos, volviendo a formar TAG. Recuérdese del Capítulo 15 que estos ciclos de sustrato permiten una regulación fina de la velocidad y dirección del flujo de intermediarios a través de una ruta bidireccional. En el tejido adiposo, el glicerol liberado por las lipasas de los adipocitos no se puede reutilizar en la síntesis de TAG, porque los adipocitos no poseen el enzima glicerol quinasa. En cambio, el glicerol fosfato que se necesita para la síntesis de TAG se forma a partir del piruvato por gliceroneogénesis, en la que interviene el enzima citosólico PEP carboxiquinasa (véase la Fig. 21-22).

Además de su función principal como depósito energético, el tejido adiposo juega un papel importante como órgano endocrino, produciendo y liberando hormonas, que indican el estado de las reservas energéticas y coordinan el metabolismo de las grasas y de los glúcidos en todo el organismo. Volveremos sobre esta función en la Sección 23.4 cuando discutamos la regulación hormonal de la masa corporal.

Los tejidos adiposos marrón y beige son termogénicos

En los vertebrados de pequeño tamaño y en los animales que hibernan, una parte importante del tejido adiposo es **tejido adiposo marrón (BAT)**, que se distingue del WAT por el menor tamaño (diámetro entre 20 y 40 μm) y la diferente forma (poligonal, no redonda) de los adipocitos (Fig. 23-17b, d). Al igual que los adipocitos blancos, los adipocitos marrones almacenan TAG, pero en varias gotas lipídicas más pequeñas por célula, en lugar de en una sola gota central. Las células del BAT tienen más mitocondrias y una mayor vascularización e inervación que las células del WAT, y son los citocromos de las mitocondrias y la hemoglobina de los capilares que confieren al BAT su característico color marrón. Una característica única de los adipocitos marrones es su producción **proteína desacopladora 1 (UCP1)** también denominada termogenina, (véase la Fig. 19-36). Esta proteína es responsable de una de las principales funciones del BAT: la **termogénesis**.

En los adipocitos marrones, los ácidos grasos almacenados en gotas de lípido se liberan, entran en las mitocondrias y se convierten por completo en CO_2 por la vía de la β oxidación y el ciclo del ácido cítrico. El $FADH_2$ y el NADH reducidos obtenidos de este modo transfieren sus electrones al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria. En el WAT, los protones bombeados fuera de la mitocondria durante la transferencia de electrones vuelven a entrar en la matriz a través de la ATP sintasa, y la energía de la transferencia de electrones se aprovecha para la síntesis de ATP. En el BAT, la UCP1 suministra una vía alternativa para la reentrada de los protones en la matriz que evita la ATP sintasa; la energía del gradiente de protones se disipa, pues, como calor, que mantiene al organismo (especialmente el sistema nervioso y las vísceras) a temperatura óptima cuando la temperatura ambiente es relativamente baja.

En el feto humano, la diferenciación de los fibroblastos preadipocitos en BAT empieza en la vigésima semana de gestación, y en el momento del nacimiento el BAT representa el 1% de la masa corporal total. Los depósitos de grasa marrón están localizados donde el calor generado por termogénesis puede garantizar que los tejidos vitales, los vasos sanguíneos de la cabeza, los vasos abdominales principales y las vísceras, incluidos el páncreas, las glándulas suprarrenales y los riñones, no se enfríen en exceso cuando el recién nacido entra en un mundo con menor temperatura ambiente **(Fig. 23-18)**.

En el nacimiento empieza a desarrollarse el WAT mientras que el BAT empieza a desaparecer. En la edad adulta joven los humanos tienen unos depósitos de BAT muy disminuidos, desde un 3% de todo el tejido adiposo en los machos hasta el 7% en las hembras, lo que constituye menos del 0,1% de la masa corporal. No obstante, los adultos tienen, distribuidos entre sus células de WAT, una cantidad significativa de adipocitos que pue-

den convertirse, por exposición al frío o por estimulación β-adrenérgica, en células muy parecidas a los adipocitos marrones. Estos **adipocitos beige** tienen múltiples gotículas de lípido, mayor número de mitocondrias que los adipocitos blancos y producen UCP1, por lo que pueden actuar de manera efectiva como generadores de calor. Los adipocitos marrones y beige producen calor al oxidar sus propios ácidos grasos pero también captan y oxidan tanto ácidos grasos como glucosa de la sangre a velocidades que no están en proporción a su masa. De hecho, la detección de BAT mediante PET de barrido depende de la velocidad relativamente alta de captación y metabolismo de la *glucosa* por parte de los adipocitos (Fig. 23-18b). Las personas con feocromocitoma (tumores de la cápsula suprarrenal) producen adrenalina y noradrenalina en exceso y uno de los efectos es que estas hormonas estimulan el desarrollo del tejido adiposo beige, localizado aproximadamente como en los recién nacidos. En la adaptación a ambientes fríos y templados y en la diferenciación normal de WAT y BAT y tejido adiposo beige juega un papel central el factor de transcripción nuclear PPARγ (descrito más adelante en este capítulo). Y tal como se ha mencionado anteriormente la hormona peptídica irisina, producida en el músculo debido al ejercicio, desencadena el desarrollo de tejido adiposo beige que continúa quemando combustible durante un largo período después del final del ejercicio.

Los músculos utilizan ATP para realizar trabajo mecánico

El metabolismo de las células del músculo esquelético, los **miocitos,** está especializado en generar ATP como



FIGURA 23-18 Tejido adiposo marrón en recién nacidos y adultos. **(a)** Los recién nacidos humanos tienen grasa marrón distribuida tal como se muestra para proteger la médula espinal, los vasos sanguíneos principales y los órganos internos. **(b)** Escanes de tomografía de emisión de positrones (PET) pueden mostrar actividad metabólica en una persona viva en tiempo real. Los escanes de PET permiten la visualización de glucosa marcada isotópicamente en regiones del cuerpo localizadas con precisión. Un análogo de la glucosa emisor de positrones, el 2-[^{18}F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG), se inyecta en el torrente sanguíneo; poco después un escán de PETmuestra cuanta glucosa ha sido captada por las diferentes partes del cuerpo lo que es una medida de la actividad metabólica. A la izquierda se muestra un escán de un hombre sano de 25 años que había ayunado durante 12 horas, a continuación estuvo una hora en una habitación fría (19 °C), con sus piernas en hielo para que se enfriase en su totalidad. Al acabar la hora se le inyectó [^{18}F]-FDG y, a continuación, permaneció en condiciones de frío durante otra hora. Se realizaron entonces escanes de PET del cuerpo entero a 24 °C. Para el escán de control el mismo hombre se sometió al mismo protocolo de escán de PET dos semanas después, pero esta vez después de 2 horas a 27 °C en lugar del enfriamiento (derecha). El intenso marcado del cerebro y el corazón muestra niveles elevados de captación de glucosa; el marcado de los riñones y de la vejiga indica eliminación de FDG. En el escán después del enfriamiento (derecha), el [^{18}F]-FDG marca el BAT en la región por encima de la clavícula y a lo largo de las vértebras. [Fuentes: (a) Adam Steinberg. (b) Reproducido con permiso de American Diabetes Association, a partir de M. Saito et al., *Diabetes* 58:1526, 2009, Fig. 1; permiso tramitado a través de Copyright Clearance Center, Inc.]

fuente inmediata de energía para la contracción. Además, el músculo esquelético está adaptado para realizar trabajo mecánico de forma intermitente, según la demanda. A veces, el músculo esquelético debe trabajar a su máxima capacidad durante un tiempo corto, como en una carrera de 100 m; otras veces se requiere un esfuerzo más prolongado, como en una maratón o durante un trabajo físico prolongado.

Existen dos clases generales de tejido muscular, que difieren en su función fisiológica y en la utilización de combustibles. El **músculo de contracción lenta,** también denominado músculo rojo, proporciona una tensión relativamente baja pero es muy resistente a la fatiga. Produce ATP por el proceso relativamente lento, pero constante, de la fosforilación oxidativa. El músculo rojo es muy rico en mitocondrias y está irrigado por una densa red de vasos sanguíneos que aportan el oxígeno necesario para la producción de ATP. El **músculo de contracción rápida,** o músculo blanco, tiene menos mitocondrias que el músculo rojo y tiene un menor aporte de vasos sanguíneos, pero puede desarrollar una tensión mayor y más rápidamente. El músculo blanco se fatiga más pronto porque cuando es activo utiliza el ATP a un ritmo por encima de su capacidad de reemplazarlo. Existe un componente genético en la proporción de músculo rojo y músculo blanco en cada individuo, pero con el entrenamiento puede mejorarse la resistencia del músculo de contracción rápida.

Los músculos esqueléticos pueden utilizar ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos o glucosa como fuente de energía, según el grado de actividad muscular **(Fig. 23-19)**. En el músculo en reposo los combustibles principales son los ácidos grasos libres procedentes del tejido adiposo y los cuerpos cetónicos procedentes del hígado. Estos compuestos se oxidan y se degradan para dar acetil-CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico dando finalmente la energía para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. Los músculos moderadamente activos utilizan glucosa sanguínea, además de ácidos grasos y cuerpos cetónicos. La glucosa se fosforila y, a continuación, se degrada en la glucólisis hasta piruvato, que se convierte en acetil-CoA y se oxida por la vía del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa.

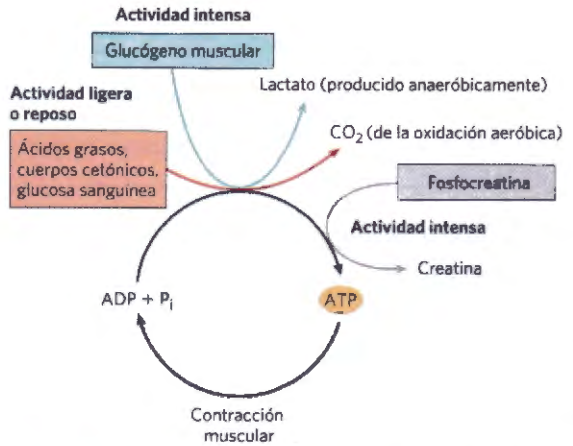


FIGURA 23-19 Fuentes de energía para la contracción muscular. Se utilizan diferentes combustibles para la síntesis de ATP durante la actividad intensa y durante la actividad ligera o el reposo. El ATP se puede obtener rápidamente a partir de la fosfocreatina.

En los músculos de contracción rápida con actividad máxima, la demanda de ATP es tan grande que el flujo sanguíneo no puede suministrar O_2 y combustibles a suficiente velocidad para cubrir las necesidades de ATP solamente a través de la respiración aeróbica. En estas circunstancias, el glucógeno almacenado en el músculo se degrada hasta lactato por fermentación. Cada unidad de glucosa degradada proporciona tres ATP, porque la fosforólisis del glucógeno produce glucosa 6-fosfato (vía glucosa 1-fosfato), y ahorra el ATP que es consumido normalmente en la reacción de la hexoquinasa. La fermentación a ácido láctico responde así a un aumento en las necesidades de ATP, suplementando la producción basal de ATP procedente de la oxidación aeróbica de otros combustibles por la vía del ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria. La utilización de la glucosa sanguínea y del glucógeno muscular como combustibles para la actividad muscular aumenta de forma importante con la secreción de adrenalina, que estimula tanto la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático como la degradación del glucógeno en el tejido muscular. (La adrenalina desencadena la respuesta llamada luchar o volar, que se discute con mayor detalle más adelante)

Las cantidades relativamente pequeñas de glucógeno (alrededor de un 1% del peso total del musculo esquelético) limitan la energía que se puede obtener por la vía glucolítica durante el ejercicio máximo. Además, la acumulación de lactato y la consiguiente disminución de pH que tiene lugar en los músculos activos al límite reducen su eficacia. El músculo esquelético contiene, sin embargo, otra fuente de ATP, en forma de fosfocreatina (10-30 mM), que puede regenerar rápidamente ATP a partir de ADP por la reacción de la creatina quinasa:



Durante períodos de contracción activa y glucólisis, esta reacción transcurre predominantemente en la dirección de síntesis de ATP; durante la recuperación del ejercicio físico excesivo el mismo enzima resintetiza fosfocreatina a partir de creatina y ATP. Dados los niveles relativamente elevados de ATP y de fosfocreatina en el músculo, estos componentes pueden detectarse en tiempo real por espectroscopia de RMN **(Fig. 23-20)**. La creatina actúa como lanzadera de equivalentes de ATP desde la mitocondria a sitios de consumo de ATP y puede constituir el factor limitante en el desarrollo de nuevo tejido muscular (Recuadro 23-2).

Después de un período de actividad muscular intensa, el individuo continúa respirando profundamente durante algún tiempo, utilizando gran parte del O_2 extra para la fosforilación oxidativa en el hígado. El ATP producido se utiliza para la gluconeogénesis (en el hígado)

RECUADRO 23-2 Creatina y creatina quinasa: Valiosas ayudas para el diagnóstico y amigas de los culturistas

En los tejidos animales con una necesidad fluctuante de ATP, principalmente el músculo esquelético, el músculo cardíaco y el cerebro contienen diversos isozimas de la creatina quinasa (cCK). En las regiones de elevada utilización de ATP (por ejemplo miofibrillas y retículo sarcoplasmático) se encuentra un isozima citosólico. Al convertir el ADP producido durante períodos de uso elevado de ATP de nuevo en ATP, la cCK impide la acumulación de ADP en concentraciones que inhibirían los enzimas productores de ATP debido a la acción de masas. Otro isozima de la creatina quinasa está localizado en regiones en donde están en contacto las membranas interna y externa de la mitocondria. Este isozima mitocondrial (mCK) sirve probablemente para lanzar equivalentes de ATP producidos en la mitocondria a los sitios citosólicos de utilización de ATP (Fig. 1). La especie que difunde desde la mitocondria a las actividades que consumen ATP en el citosol es, por tanto, la creatina fosfato, no el ATP. El isozima mCK se localiza junto al transportador de nucleótido de adenina (en la membrana mitocondrial interna) y la porina (en la membrana mitocondrial externa) lo que sugiere que estos tres componentes pueden funcionar conjuntamente para transportar el ATP formado en la mitocondria hasta el citosol.

En ratones que carecen del isozima mitocondrial, los miocitos compensan esta carencia produciendo más mitocondrias estrechamente asociadas a las miofibrillas y al retículo sarcoplasmático, lo que permite una difusión rápida del ATP mitocondrial a estos sitios de utilización de ATP. No obstante, estos ratones tienen una capacidad reducida para correr lo que indica un defecto en algún aspecto del metabolismo energético.

La creatina y la fosfocreatina se degradan espontáneamente dando creatinina (Fig. 2). Para mantener unos niveles elevados de creatina se han de compensar estas pérdidas ya sea mediante creatina de la dieta, obtenida principalmente de carnes (músculo) y productos lácteos o bien por la síntesis de novo de creatina a partir de glicina, arginina y metionina (Fig. 22-28), que tiene lugar sobre todo en el hígado y en el riñón. La síntesis de novo de la creatina es un consumidor principal de estos aminoácidos, especial-

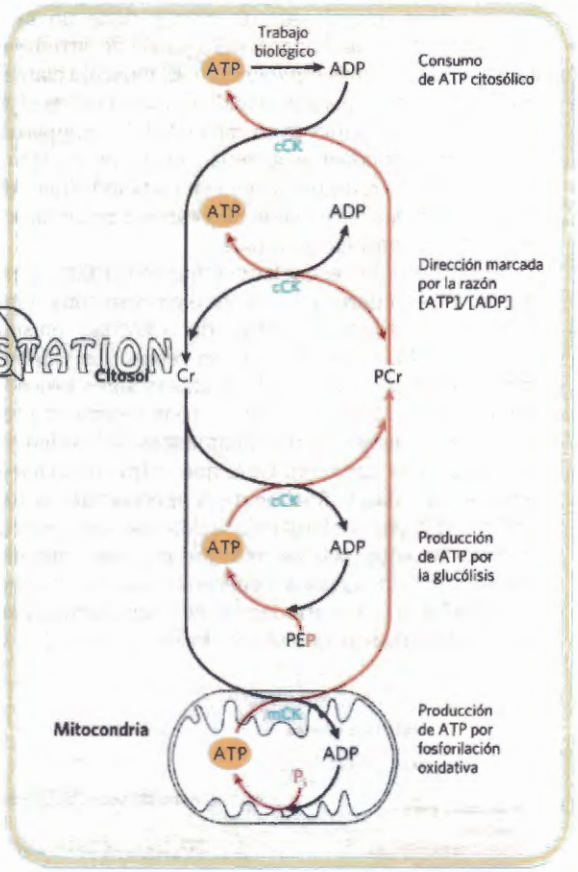


FIGURA 1 La creatina quinasa mitocondrial (mCK) transfiere un grupo fosforilo desde el ATP a la creatina (Cr) formando creatina fosfato (PCr) que difunde a sitios de utilización de ATP; en estos sitios la creatina quinasa citosólica (cCK) pasa el grupo fosforilo al ATP. La CK citosólica también puede utilizar ATP producido en la glucólisis para sintetizar PCr. Durante los períodos de poca demanda de ATP, los fondos de ATP y PCr vuelven a rellenarse como preparación al siguiente período de demanda intensa de ATP. En el músculo en reposo, la concentración de PCr es de 3 a 5 veces la de ATP, con lo que se tampona a la célula contra una eliminación rápida de ATP durante períodos intensos pero cortos de demanda de ATP. [Fuente: Información de U. Schlattner et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1762:164, 2006, Fig. 1.]

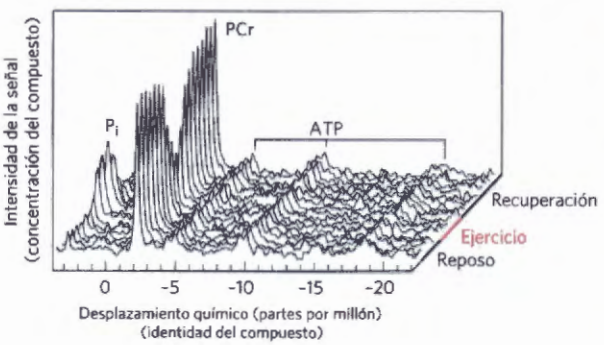


FIGURA 23-20 La fosfocreatina tampona la concentración de ATP durante el ejercicio. "Representación apilada" de espectros de resonancia magnética nuclear (de ^{31}P) que muestran el fosfato inorgánico (P_i), la fosfocreatina (PCr) y el ATP (cada uno de los tres fosfatos da una señal). Esta serie de gráficas representa el paso del tiempo entre un período de descanso a uno de ejercicio, seguido de recuperación. Observe que la señal del ATP apenas cambia durante el ejercicio, que se mantiene elevada por la respiración continuada y por la reserva de fosfocreatina, que disminuye durante el ejercicio. Durante la recuperación, la producción de ATP por el catabolismo es mayor que el gasto de ATP por el músculo (ahora en reposo) mientras que se recupera la reserva de fosfocreatina. [Fuente: Datos de M. L. Blei, K. E. Conley y M. J. Kushmerick, *J. Physiol.* 465:203, 1993, Fig. 4.]

mente en los vegetarianos para los que es la única fuente de creatina; los vegetales no contienen creatina. El tejido muscular tiene un sistema específico para la captación de creatina (exportada por el hígado o el riñón) y transportada por la sangre hacia el interior de las células, contra un gradiente de concentración importante. La captación eficiente de creatina de la dieta requiere ejercicio continuo; sin ejercicio, los suplementos de creatina carecen de valor.

El músculo cardíaco contiene un isozima único de la creatina quinasa (el isozima MB) que no se encuentra normalmente en la sangre pero que aparece allí cuando se libera del músculo cardíaco a consecuencia de un ataque al corazón. El nivel sanguíneo de MB empieza a aumentar dentro de las 2 horas del ataque al corazón, alcanza un máximo típicamente entre las 12 y 36 horas del ataque y vuelve a sus niveles normales al cabo de 3 a 5 días. La cuantificación del isozima MB en sangre confirma, por tanto, el diagnóstico de un ataque al corazón e indica, aproximadamente, el momento en que ocurrió.

Los niños con errores congénitos en los enzimas de la síntesis o captación de creatina sufren incapacidad intelectual y convulsiones. Tienen unos niveles muy reducidos de creatina en el cerebro según mediciones con RMN (véase la Fig. 23-20). Los suplementos de creatina elevan sus concentraciones cerebrales de creatina y creatina fosfato y resultan en una mejora parcial de los síntomas.

En el riñón sano, la creatinina procedente de la degradación de la creatina se elimina eficientemente desde la sangre a la orina. Cuando la función renal es defectuosa, los niveles de creatinina en sangre se elevan por encima del nivel normal entre 0,8 y 1,4 mg/dL. Una cretinina sanguínea elevada está asociada con fallo renal en la diabetes y otras enfermedades en las que la función renal está temporal o permanentemente afectada. La eliminación renal de la creatinina varía ligeramante con la edad, raza y género por lo que la corrección de los cálculos en función de estos factores proporciona una medida más sensible de la gravedad de la función renal, la **tasa de filtración glomerular (GFR)**. ■

Los culturistas que añaden masa muscular tienen una mayor necesidad de creatina por lo que, frecuentemente, ingieren suplementos de hasta 20 g de creatina al día durante unos días, seguido de unas dosis de mantenimiento. La combinación de ejercicio y suplemento de creatina aumenta la masa muscular (Fig. 3) y mejora las actuaciones de intensidad elevada y trabajo de corta duración.

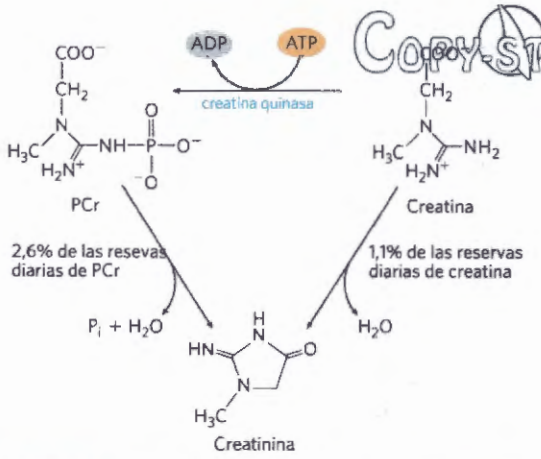


FIGURA 2 La formación espontánea (no enzimática) de creatinina a partir de fosfocreatina o creatina consume un pequeño porcentaje de la creatina corporal total diaria que se ha de reemplazar por biosíntesis o aporte nutricional.



FIGURA 3 Muchos culturistas toman a menudo suplementos de creatina para suministrar creatina fosfato al nuevo tejido muscular. [Fuente: Steve WilliAMA Photo/Getty Images.]

a partir de lactato, que es transportado por la sangre desde los músculos. La glucosa así formada vuelve a los músculos para restablecer sus reservas de glucógeno, completando así el ciclo de Cori (**Fig. 23-21**; véase también el Recuadro 15-4).

Durante la contracción activa del músculo esquelético se genera calor a consecuencia del acoplamiento imperfecto de la energía química del ATP con el trabajo mecánico de la contracción. Esta producción de calor es aprovechada cuando la temperatura ambiente es baja: el músculo esquelético activa la **tiritera termógena**, contracciones musculares rápidas, que producen calor pero poco movimiento y ayudan a mantener el cuerpo a su temperatura preferida de 37 °C.

El músculo cardíaco difiere del músculo esquelético por mantener una actividad continua, con un ritmo regular de contracción y relajación con un metabolismo completamente aeróbico en todo momento. Las mitocondrias son mucho más abundantes en el músculo cardíaco que en el músculo esquelético, llegando a representar casi la mitad del volumen de la célula (**Fig. 23-22**). El corazón utiliza como fuente de energía principalmente ácidos grasos libres, pero también algo de glucosa y cuerpos cetónicos, captados de la sangre;

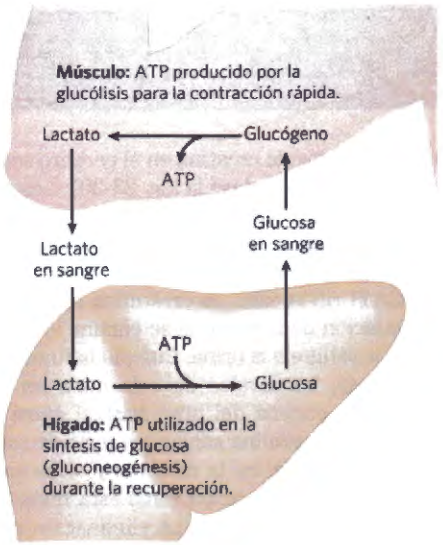


FIGURA 23-21 Cooperación metabólica entre el músculo esquelético y el hígado: ciclo de Cori. Los músculos muy activos utilizan glucógeno como fuente de energía, produciendo lactato por la vía glucolítica. Durante la recuperación, parte de este lactato se transporta hasta el hígado y se convierte en glucosa por gluconeogénesis. Esta glucosa se vierte a la sangre y vuelve al músculo para restablecer las reservas de glucógeno. La ruta global (glucosa ⟶ lactato ⟶ glucosa) constituye el ciclo de Cori.

estos combustibles se oxidan aeróbicamente para generar ATP. Al igual que el músculo esquelético, el músculo cardíaco no almacena lípidos ni glucógeno en grandes cantidades. Tiene pequeñas cantidades de energía de reserva, suficientes para unos pocos segundos de contracción, en forma de fosfocreatina. Puesto que el corazón es normalmente aeróbico y obtiene su energía de la fosforilación oxidativa, la falta de O_2 en una parte del músculo cardíaco cuando los vasos sanguíneos se bloquean por depósitos lipídicos (aterosclerosis) o por coágulos sanguíneos (trombosis coronaria), puede provocar la muerte de esta zona del músculo. Este proceso se conoce como infarto de miocardio o, más comúnmente, como ataque cardíaco. ■

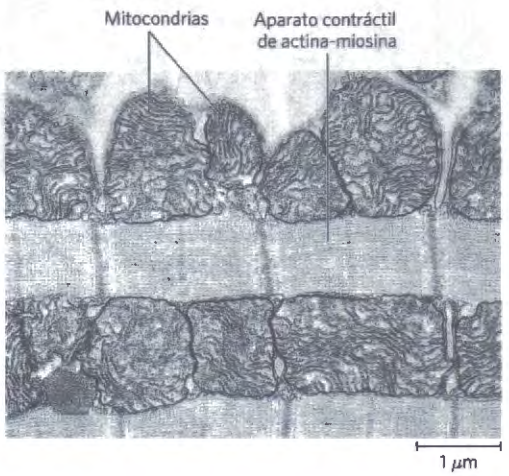


FIGURA 23-22 Micrografía electrónica del músculo cardíaco. El piruvato (procedente de la glucosa), los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos se oxidan en las abundantes mitocondrias del tejido cardíaco para impulsar la síntesis de ATP. Este metabolismo aeróbico constante permite al corazón humano bombear sangre a un ritmo de cerca de 6 L/min, equivalente a unos 350 L/h lo que significa 200 x 10^6 L de sangre en 70 años. [Fuente: D. W. Fawcett/Science Source.]

El cerebro consume energía para la transmisión de los impulsos eléctricos

El metabolismo del cerebro es notable en varios aspectos. Las neuronas del cerebro de los mamíferos adultos normalmente sólo utilizan glucosa como combustible **(Fig. 23-23)**. (Los astrocitos, el otro tipo de célula principal del cerebro, pueden oxidar ácidos grasos). El cerebro, que constituye alrededor del 2% de la masa corporal total, tiene un metabolismo respiratorio muy activo (Fig. 23-18); más del 90% del ATP producido en las neuronas proviene de la fosforilación oxidativa. El cerebro consume O_2 a un ritmo bastante constante, que representa casi el 20% del total del O_2 consumido por el organismo en reposo. Puesto que el cerebro contiene muy poco glucógeno, depende de forma permanente de la glucosa que llega por la sangre. Si la glucosa en sangre disminuye significativamente por debajo de un nivel crítico, incluso durante un período de tiempo corto, pueden producirse graves alteraciones, a veces irreversibles, en la función cerebral.

Aunque las neuronas del cerebro no pueden utilizar directamente los ácidos grasos libres o los lípidos de la sangre como combustibles, pueden, si es necesario, obtener hasta el 60% de sus necesidades energéticas de la oxidación del β-hidroxibutirato (un cuerpo cetónico) formado en el hígado a partir de los ácidos grasos. La capacidad del cerebro para oxidar el β-hidroxibutirato por la vía del acetil-CoA adquiere importancia durante los períodos de ayuno prolongado o inanición, después de haberse agotado el glucógeno hepático, puesto que ello permite al cerebro utilizar la grasa del organismo como fuente de energía. Se preservan, así, las proteínas musculares hasta que se convierten en el último recurso del cerebro para obtener glu-

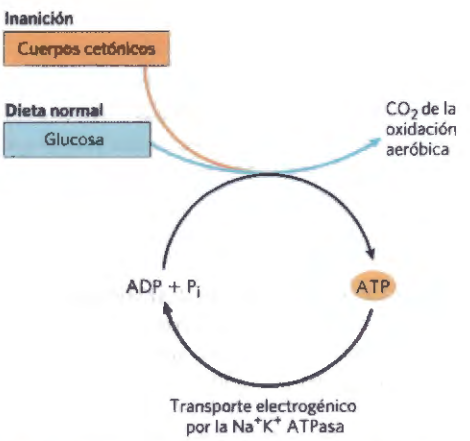


FIGURA 23-23 Los combustibles que suministran ATP al cerebro Las fuentes de energía para el cerebro varían según el estado nutricional. El cuerpo cetónico utilizado por el cerebro durante la inanición es el β-hidroxibutirato. El transporte electrogénico por la Na^+K^+ ATPasa mantiene el potencial transmembrana, esencial para la transferencia de información entre las neuronas.

cosa, a través de la gluconeogénesis en el hígado, durante la inanición severa.

En las neuronas se necesita energía para crear y mantener un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. La membrana contiene un cotransportador electrogénico antiparalelo dependiente de ATP, la Na^+K^+ ATPasa, que bombea simultáneamente 2 iones K^+ hacia dentro y 3 iones Na^+ hacia fuera de la neurona (véase la Fig. 11-36). El potencial transmembrana resultante cambia transitoriamente a medida que una señal eléctrica, potencial de acción, se transmite de un extremo a otro de la neurona (véase la Fig. 12-29). Los potenciales de acción son el principal mecanismo de transferencia de información en el sistema nervioso de modo que la falta de ATP en las neuronas tiene efectos desastrosos sobre todas las actividades coordinadas por señalización neuronal.

La sangre transporta oxígeno, metabolitos y hormonas

La sangre actúa de mediador de las interacciones metabólicas entre los tejidos. Transporta nutrientes desde el intestino delgado al hígado y desde el hígado y el tejido adiposo a otros órganos; también transporta productos de desecho desde los tejidos extrahepáticos al hígado para su transformación y, hasta los riñones para su excreción. El oxígeno se desplaza en la sangre desde los pulmones a los tejidos, y el CO_2 generado por la respiración tisular vuelve por la sangre a los pulmones para su exhalación. La sangre también transporta señales hormonales de un tejido a otro. En su papel de transportador de señales, el sistema circulatorio se parece al sistema nervioso; ambos regulan e integran las actividades de diferentes órganos.

Un ser humano adulto medio tiene entre 5 y 6 L de sangre. Casi la mitad de este volumen está ocupado por tres tipos de células sanguíneas **(Fig. 23-24)**: **eritrocitos** (glóbulos rojos), cargados de hemoglobina y especializados en el transporte de O_2 y CO_2; una cantidad mucho menor de **leucocitos** (glóbulos blancos) de diferentes tipos (entre ellos los **linfocitos,** que también se encuentran en el tejido linfático), esenciales para el sistema inmunitario que defiende al organismo contra las infecciones; y **plaquetas** (fragmentos celulares), que participan en la coagulación sanguínea. La parte líquida es el **plasma sanguíneo**, que contiene un 90% de agua y un 10% de solutos. Disueltos o en suspensión en el plasma hay una gran cantidad de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabolitos, productos de desecho, iones inorgánicos y hormonas. Más del 70% de los sólidos del plasma son **proteínas plasmáticas**, principalmente inmunoglobulinas (anticuerpos circulantes), seroalbúmina, apolipoproteínas (para el transporte de lípidos), transferrina (para el transporte de hierro) y proteínas para la coagulación sanguínea tales como el fibrinógeno y la protrombina.

Los iones y los solutos de baja masa molecular en el plasma sanguíneo no son componentes permanentes, sino que se hallan en flujo continuo entre la sangre y los diferentes tejidos. La incorporación de iones inorgánicos de la dieta, que son los electrolitos predominantes de la sangre y del citosol (Na^+, K^+ y Ca^{2+}), resulta generalmente compensada por su excreción en la orina. Muchos componentes de la sangre están cerca de un estado estacionario dinámico; la concentración de un

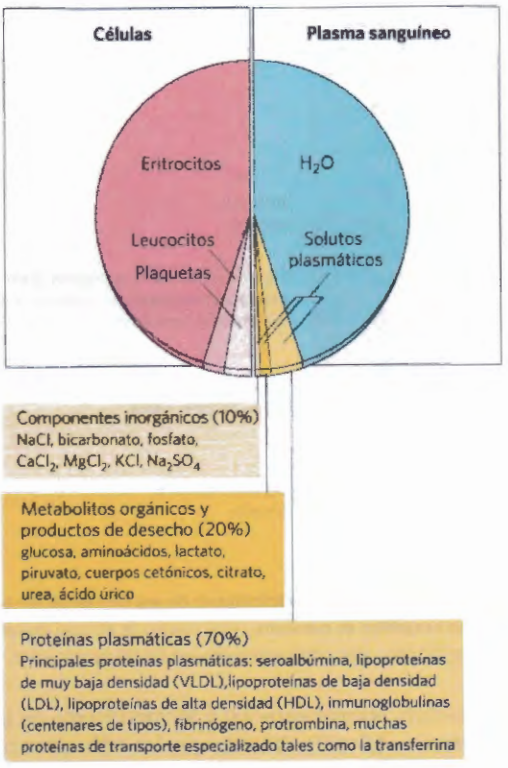


FIGURA 23-24 Composición de la sangre (en peso). La sangre completa puede separarse por centrifugación en plasma sanguíneo y células. Alrededor de un 10% del plasma sanguíneo son solutos, de los que un 10% son sales inorgánicas, un 20% moléculas orgánicas pequeñas y un 70% proteínas plasmáticas. En la figura se muestran los principales componentes disueltos. La sangre contiene otras muchas sustancias, a menudo en muy pequeñas cantidades, tales como metabolitos, enzimas, hormonas, vitaminas, oligoelementos y pigmentos biliares. La cuantificación de las concentraciones de los componentes del plasma sanguíneo es importante para el diagnóstico y el tratamiento de muchas enfermedades.

compuesto se modifica poco aunque haya un flujo continuo desde el aparato digestivo, a través de la sangre y hacia la orina. Los niveles plasmáticos de Na^+, K^+ y Ca^{2+} se mantienen alrededor de 140, 5 y 2,5 mM, respectivamente, con independencia de la ingesta. Cualquier desviación importante de estos valores puede tener como consecuencia una enfermedad grave o la muerte. Los riñones tienen un papel especialmente importante en el mantenimiento del equilibrio iónico, actuando como un filtro selectivo de los productos de desecho y del exceso de iones de la sangre, mientras que los nutrientes y los iones esenciales son retenidos.

El eritrocito humano pierde su núcleo y mitocondrias durante la diferenciación. Depende solamente de la glucólisis para su suministro de ATP. El lactato producido en la glucólisis vuelve al hígado, en donde se convierte en glucosa por la gluconeogénesis y se almacena en forma de glucógeno o recircula hacia los tejidos periféricos. El eritrocito tiene un acceso constante a la glucosa de la sangre.

La concentración de glucosa en el plasma también está sujeta a una regulación rígida. Ya hemos mencionado la dependencia constante del cerebro respecto de la glucosa y el papel del hígado en el mantenimiento de la glucosa en sangre dentro de su

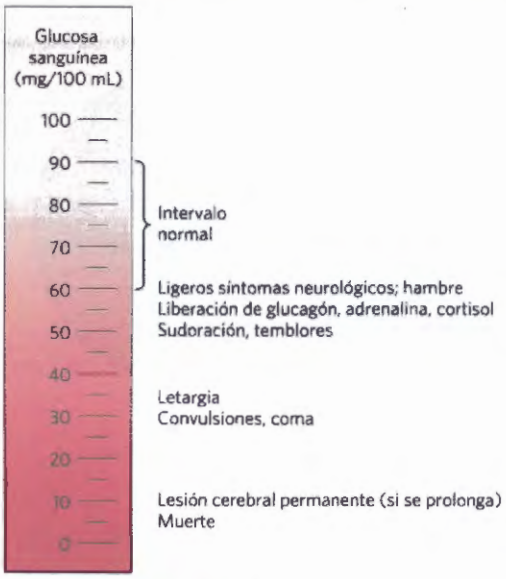


FIGURA 23-25 Efectos fisiológicos de una concentración baja de glucosa sanguínea en humanos. Unos niveles de glucosa en sangre de 40 mg/100 mL o inferiores constituyen una hipoglucemia grave.

intervalo normal entre 60 y 90 mg/100 mL en la sangre entera (~4,5 mM). (Puesto que los eritrocitos representan una fracción significativa del volumen sanguíneo, su eliminación por centrifugación permite obtener un sobrenadante fluido, el plasma, que contiene la "glucosa sanguínea" en un volumen más pequeño. Para convertir la concentración de la glucosa en sangre en glucosa plasmática hay que multiplicar el nivel de glucosa en sangre por 1,14). Cuando la glucosa en sangre de un ser humano cae hasta 40 mg/100 mL (estado hipoglucémico) se experimenta malestar y confusión mental (**Fig. 23-25**); ulteriores disminuciones conducen al coma, convulsiones y, en una hipoglucemia extrema, a la muerte. El mantenimiento de la concentración normal de glucosa en la sangre es, pues, una prioridad muy alta para el organismo por lo que diversos mecanismos han evolucionado con esta finalidad. Entre los reguladores más importantes de la glucosa en sangre se hallan las hormonas insulina, glucagón y adrenalina, que se examinan en la sección siguiente. ■

RESUMEN 23.2 Metabolismo específico de los tejidos: división del trabajo

■ En los mamíferos hay una división del trabajo metabólico entre tejidos y órganos especializados. El hígado es el órgano que centraliza la transformación y la distribución de los nutrientes. Los azúcares y aminoácidos producidos en la digestión atraviesan el epitelio intestinal y entran en la sangre, que los transporta hasta el hígado. Algunos triacilgliceroles procedentes de lípidos de la dieta también alcanzan el hígado, donde sus ácidos grasos constituyentes se utilizan en toda una serie de procesos.

■ La glucosa 6-fosfato es el intermediario clave del metabolismo de los glúcidos. Puede polimerizarse para dar glucógeno, puede desfosforilarse a glucosa sanguínea o convertirse en ácidos grasos a través del acetil-CoA. Puede ser oxidada por la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria para proporcionar ATP o entrar en la vía de las pentosas fosfato para proporcionar pentosas y NADPH.

■ Los aminoácidos se utilizan para sintetizar proteínas hepáticas y plasmáticas, o bien sus esqueletos carbonados pueden ser convertidos en glucosa y glucógeno a través de la gluconeogénesis; el amoníaco formado por desaminación se convierte en urea.

■ El hígado convierte los ácidos grasos en TAG, fosfolípidos o colesterol y sus ésteres para su transporte en forma de lipoproteínas plasmáticas hasta el tejido adiposo donde se almacenan. Los ácidos grasos también se pueden oxidar para dar ATP o para formar cuerpos cetónicos, que se enviarán a otros tejidos.

■ El tejido adiposo blanco almacena grandes reservas deTAG y los libera en la sangre como respuesta a la adrenalina y el glucagón. El tejido adiposo marrón está especializado en la termogénesis, que resulta de la oxidación de los ácidos grasos en mitocondrias desacopladas. El tejido adiposo beige se expande en respuesta a las bajas temperaturas y a la estimulación por adrenalina. Al igual que en el tejido adiposo marrón, las mitocondrias del tejido adiposo beige tiene proteína desacoplante y están especializadas para la termogénesis.

■ El músculo esquelético está especializado en la producción y utilización de ATP para el trabajo mecánico. Durante una actividad muscular suave o moderada, la oxidación de ácidos grasos y de glucosa es la fuente principal de ATP. Durante un esfuerzo muscular vigoroso, el glucógeno es el combustible fundamental, proporcionando ATP por fermentación hasta ácido láctico. Durante la recuperación, el lactato se reconvierte (a través de la gluconeogénesis) en glucógeno y glucosa en el hígado para recuperar el suministro de glucógeno muscular. La fosfocreatina es una fuente inmediata de ATP durante la contracción activa.

■ El músculo cardíaco obtiene casi todo su ATP a partir de la fosforilación oxidativa con ácidos grasos como combustible principal.

■ Las neuronas del cerebro sólo utilizan glucosa y *3*-hidroxibutirato como fuentes de energía; el segundo es importante durante el ayuno y la inanición. El cerebro utiliza la mayor parte de su ATP para el transporte de Na^+ y K^+ para mantener el potencial eléctrico a través de las membranas neuronales.

■ La sangre transporta nutrientes, productos de desecho y señales hormonales entre los tejidos y órganos. Está formada por células (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y agua rica en electrolitos (plasma) que contiene muchas proteínas.

23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético

Los ajustes constantes que mantienen los niveles de glucosa en sangre alrededor de 4,5 mM son el resultado de la acción combinada de la insulina, el glucagón, la adrenalina y el cortisol sobre los procesos metabólicos que tienen lugar en muchos tejidos corporales, pero especialmente en el hígado, el músculo y el tejido adiposo. La insulina indica a estos tejidos que la concentración de glucosa en sangre es superior a la necesaria; como consecuencia, el exceso de glucosa sanguínea es

TABLA 23-4 Efecto de la insulina sobre la glucosa sanguínea: captación de glucosa por las células y almacenamiento como triacilgliceroles y glucógeno

Efecto metabólico	Enzima diana
↑ Captación de glucosa (músculo, adiposo)	↑ Transportador de glucosa (GLUT4)
↑ Captación de glucosa (hígado)	↑ Glucoquinasa (aumento de la expresión)
↑ Síntesis de glucógeno (hígado, músculo)	↑ Glucógeno sintasa
↓ Degradación de glucógeno (hígado, músculo)	↓ Glucógeno fosforilasa
↑ Glucólisis, producción de acetil-CoA (hígado, músculo)	↑ PFK-1 (por PFK-2) ↑ Complejo de la piruvato deshidrogenasa
↑ Síntesis de ácidos grasos (hígado)	↑ Acetil-CoA carboxilasa
↑ Síntesis de triacilgliceroles (tejido adiposo)	↑ Lipoproteína lipasa

captado por las células y se transforma en los compuestos de almacenamiento, glucógeno y triacilgliceroles. El glucagón transmite el mensaje de que los niveles de glucosa en sangre son demasiado bajos y los tejidos responden produciendo glucosa por medio de la degradación del glucógeno y (en el hígado) de la gluconeogénesis y oxidando las grasas para reducir el consumo de glucosa. La adrenalina se libera a la sangre para preparar los músculos, pulmones y corazón para un esfuerzo súbito e importante. El cortisol facilita la respuesta corporal al estrés de larga duración. Discutiremos estas regulaciones hormonales en el contexto de tres estados metabólicos normales (bien alimentado, en ayuno e inanición) y examinaremos las consecuencias metabólicas de la diabetes mellitus, la cual es el resultado de trastornos en las rutas de señalización que controlan el metabolismo de la glucosa.

COPYSTATION

La insulina contrarresta la glucosa elevada en sangre

Actuando a través de receptores de la membrana plasmática (véanse la Figs. 12-19, 12-20), la insulina estimula la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (Tabla 23-4), donde se convierte en glucosa 6-fosfato. En el hígado, la insulina también activa la glucógeno sintasa e inactiva la glucógeno fosforilasa, de manera que buena parte de la glucosa 6-fosfato se canaliza hacia la síntesis de glucógeno.

La insulina también estimula el almacenamiento del exceso de combustible en forma de grasa en el tejido adiposo. **(Fig. 23-26)**. En el hígado, la insulina activa tanto la oxidación de la glucosa 6-fosfato a piruvato a través de la glucólisis como la oxidación del piruvato a acetil-CoA. El exceso de acetil-CoA De no necesario para producir energía, se utiliza en la síntesis de ácidos grasos, que son exportados desde el hígado como TAG de las lipoproteínas plasmáticas (VLDL; véase la Fig. 21-40) al tejido adiposo. La insulina estimula la síntesis de TAG en los adipocitos a partir de los ácidos grasos liberados de los TAG de las VLDL. Estos ácidos grasos proceden en última instancia del exceso de glucosa captada de la sangre por el hígado. En resumen, el efecto de la insulina consiste en favorecer La conversión del exceso de glucosa sanguínea en dos formas de almacenamiento: glucógeno (en el hígado y el músculo) y TAG (en el tejido adiposo).

Además de actuar directamente sobre el músculo y el hígado para cambiar su metabolismo de los glúcidos y las grasas, la insulina puede también actuar sobre estos tejidos indirectamente a través del cerebro como se describirá más adelante.

Las células β del páncreas secretan insulina en respuesta a cambios de la glucosa en sangre

Cuando la glucosa llega a la circulación sanguínea desde el intestino, después de una comida rica en glúcidos, el consiguiente aumento de glucosa en sangre provoca un aumento de la secreción de insulina (y una disminución de la secreción de glucagón) por el páncreas. La liberación de insulina está regulada en gran parte por el nivel de glucosa de la sangre que llega al páncreas. Las hormonas peptídicas insulina, glucagón y somatostatina se producen en agrupamientos de células pancreáticas especializadas, los islotes de Langerhans **(Fig. 23-27)**. Cada tipo de célula de los islotes produce una sola hormona: las células α producen glucagón, las β insulina y las δ somatostatina.

Tal como se muestra en la **Fig. 23-28**, cuando aumenta la glucosa sanguínea ❶ los transportadores GLUT2 introducen glucosa en las células β, donde se convierte inmediatamente en glucosa 6-fosfato por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) y entra en la glucólisis. El incremento en la velocidad del catabolismo de la glucosa aumenta la [ATP] ❷, lo que hace que se cierren los **canales de K^+ regulados por ATP** de la membrana plasmática. ❸ La reducción en la salida de K^+ despolariza la membrana. (Recuerde de la Sección 12.7 que la salida de K^+ a través de un canal de K^+ abierto hiperpolariza la membrana; así, el cierre del canal de K^+, por lo tanto, despolariza de modo efectivo la membrana). La despolarización de la membrana abre los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, lo que resulta ❹ en un aumento de la $[Ca^{2+}]$ que provoca ❺ la liberación de insulina por exocitosis. El cerebro integra las señales sobre suministro y demanda de energía y los estímulos procedentes de los sistemas nerviosos parasimpático y simpático también afectan (estimulan e inhiben, respectivamente), la liberación de insulina. Un simple bucle de retroalimentación limita la liberación de hormona: la insulina disminuye la glucosa sanguínea mediante la estimulación de la captación de glucosa por los tejidos; las células β detectan la disminución de glucosa en sangre por la disminución en el flujo a través de la reacción de la hexoquinasa; ello hace que la liberación de insulina se haga más lenta o cese completamente. Esta regulación

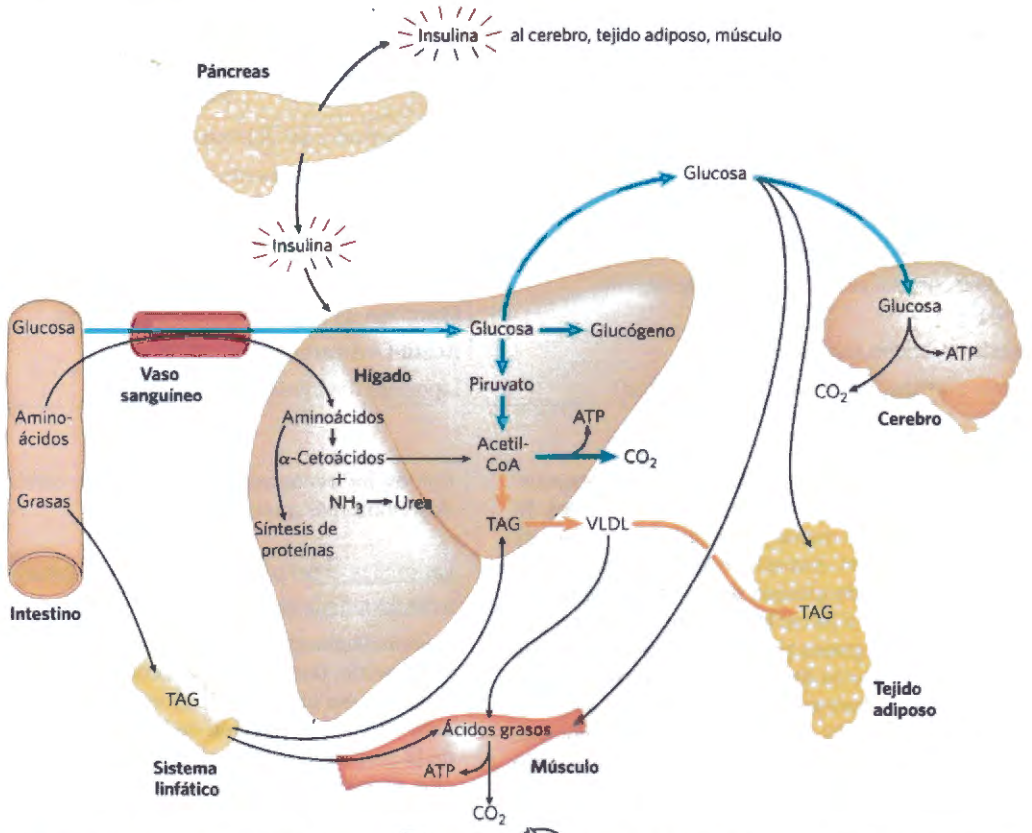


FIGURA 23-26 Estado de buena nutrición: el hígado lipogénico. Inmediatamente después de una comida rica en calorías, la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos entran en el hígado. Las flechas azules siguen la ruta de la glucosa; las flechas naranja la de los lípidos. La insulina liberada en respuesta a la elevada concentración de glucosa en sangre estimula la captación de glucosa por los tejidos. Parte de la glucosa se exporta al cerebro para cubrir sus necesidades energéticas y parte a los tejidos adiposo y muscular. En el hígado, el exceso de glucosa se oxida a acetil-CoA, que se utiliza para sintetizar triacilgliceroles para su exportación a los tejidos adiposo y muscular. El NADPH necesario para la síntesis de lípidos se obtiene de la oxidación de la glucosa en la ruta de las pentosas fosfato. Los aminoácidos en exceso se convierten en piruvato y acetil-CoA, que también se utilizan para la síntesis de lípidos. Las grasas de la dieta se transportan vía sistema linfático, en forma de quilomicrones, desde el intestino a los tejidos hepático, muscular y adiposo.

Copy-Station

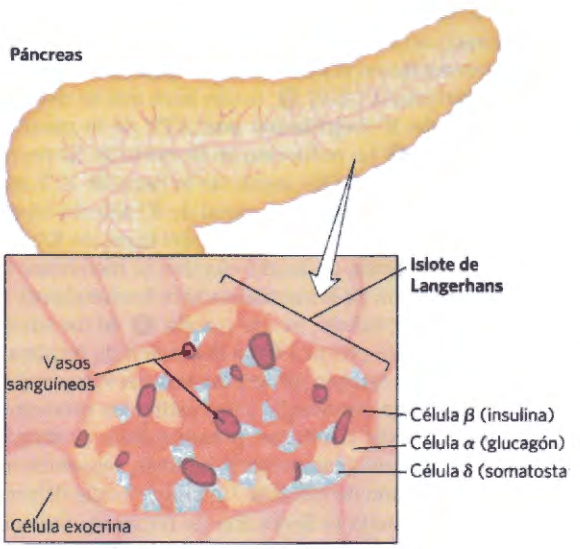


FIGURA 23-27 El sistema endocrino del páncreas. El páncreas contiene células exocrinas (véase la Fig. 18-3b), que secretan enzimas digestivos en forma de zimógenos, y agrupamientos de células endocrinas, los islotes de Langerhans. Los islotes contienen células α, β y δ (también conocidas como células A, B y D, respectivamente), cada una de las cuales segrega una hormona peptídica específica.

por retroalimentación mantiene la concentración de glucosa casi constante a pesar de grandes fluctuaciones en la ingesta.

La actividad de los canales de K^+ regulados por ATP es básica en la regulación de la secreción de insulina por las células β. Los canales son octámeros de cuatro subunidades Kir6.2 idénticas y cuatro subunidades SUR1 también idénticas, y están organizados de manera similar a los canales de K^+ de las bacterias y las de otras células eucarióticas (véanse las Fig. 11-45 y 11-46). Las cuatro subunidades Kir6.2 forman un cono alrededor del canal de K^+ y actúan de filtro selectivo y como mecanismo regulador por ATP **(Fig. 23-29)**. Cuando aumenta la [ATP], que indica un aumento de la glucosa en sangre, los canales de K^+ se cierran, se despolariza así la membrana plasmática y se desencadena la liberación de insulina, tal como se muestra en la Figura 23-28.

Las **sulfonilureas**, medicamentos utilizados por vía oral en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 se unen a las subunidades SUR1 (*sulfonyl*urea *r*eceptor) de los canales de K^+, cerrando los canales y estimulando la liberación de insulina. La primera generación de estos fármacos, incluida la tolbutamida, se desarrolló en la década de 1950. La segunda generación de fármacos, entre los que se encuentran glyburida (Micronase),

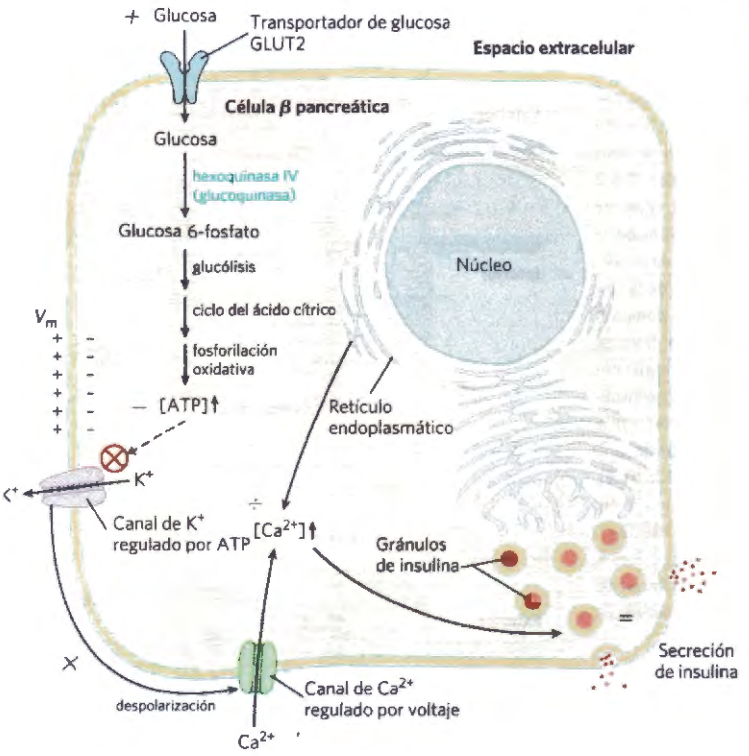
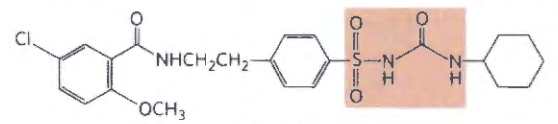
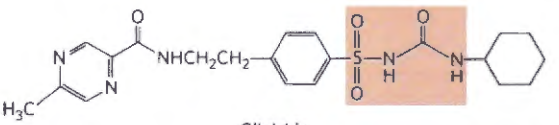


FIGURA 23-28 Regulación por la glucosa de la secreción de insulina por las células pancreáticas β. Cuando el nivel de glucosa en sangre es elevado, el metabolismo activo de la glucosa en las células β aumenta la [ATP] intracelular, lo que provoca el cierre de los canales de K^+ de la membrana plasmática y su despolarización consiguiente. En respuesta al cambio en el potencial de membrana, desencadenado por la alta [ATP] se abren canales de Ca^{2+} regulados por voltaje lo que permite el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. (El Ca^{2+} también se libera por el retículo endoplasmático, en respuesta a la elevación inicial de $[Ca^{2+}]$ en el citosol.) La $[Ca^{2+}]$ citosólica es ahora suficientemente elevada para provocar la liberación de insulina por exocitosis. Los procesos numerados se discuten en el texto.

glipizida (Glucotrol) y glimepirida (Amaryl), son más potentes y tienen menos efectos secundarios. La porción sulfonilurea está destacada en rosa en las siguientes estructuras.



Gliburida



Glipizida

Las sulfonilureas se usan, a veces, junto con insulina inyectada, pero a menudo son suficientes por sí solas para controlar la diabetes tipo 2.

Las mutaciones en los canales de K^+ controlados por ATP de las células β son, afortunadamente, raras. Las mutaciones en Kir6.2 que resultan en la *apertura* permanente de los canales de K^+ (residuos en rojo de la Fig. 23-29b) provocan diabetes mellitus neonatal con hiperglucemia severa que requiere terapia con insulina. Otras mutaciones en Kir6.2 o SUR1 (residuos azules en la Fig. 23-29b) provocan el *cierre* permanente de los canales de K^+ y la liberación continua de insulina. De no ser tratados, los individuos con estas mutaciones desarrollan hiperinsulinemia congénita (hiperinsulinismo infantil); el exceso de insulina provoca hipoglucemia grave (glucosa en sangre baja), que provoca daños irreversibles en el cerebro. Un tratamiento efectivo consiste en la extirpación de parte del páncreas para reducir la producción de insulina. ■

El glucagón contrarresta los niveles bajos de glucosa en sangre

Varias horas después de la ingestión de glúcidos en la dieta, los niveles de glucosa en sangre disminuyen ligeramente a causa de la oxidación constante de glucosa por el cerebro y otros tejidos. La disminución de glucosa en sangre desencadena la secreción de **glucagón** y disminuye la liberación de insulina **(Fig. 23-30)**.

El glucagón provoca un *aumento* de la concentración de glucosa en sangre por varias vías (Fig. 23-5). Al igual que la adrenalina, el glucagón estimula la degradación neta del glucógeno hepático al activar la glucógeno fosforilasa e inactivar la glucógeno sintasa; ambos efectos son el resultado de la fosforilación, inducida por cAMP, de los enzimas regulables. El glucagón inhibe la degradación de la glucosa por la vía glucolítica en el hígado y estimula la síntesis de glucosa por la vía gluconeogénica. Ambos efectos son el resultado de la disminución de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, un inhibidor alostérico del enzima gluconeogénico fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y activador del enzima glucolítico fosfofructoquinasa-1. Recuerde que la [fructosa 2,6-bisfosfato] está controlada en último término por una reacción de fosforilación de una proteína dependiente de cAMP (véase la Fig. 15-19). El glucagón también inhibe el enzima glucolítico piruvato quinasa, promoviendo su fosforilación dependiente de cAMP, y así bloquea la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato e impide la oxidación del piruvato por la vía del ciclo del ácido cítrico. La acumulación resultante de fosfoenolpiruvato favorece la gluconeogénesis. Este efecto es potenciado por la estimulación de la síntesis del enzima gluconeogénico PEP carboxiquinasa por el glucagón. Al estimular la degradación del glucógeno, inhibir la glucólisis y promover la gluconeogénesis en

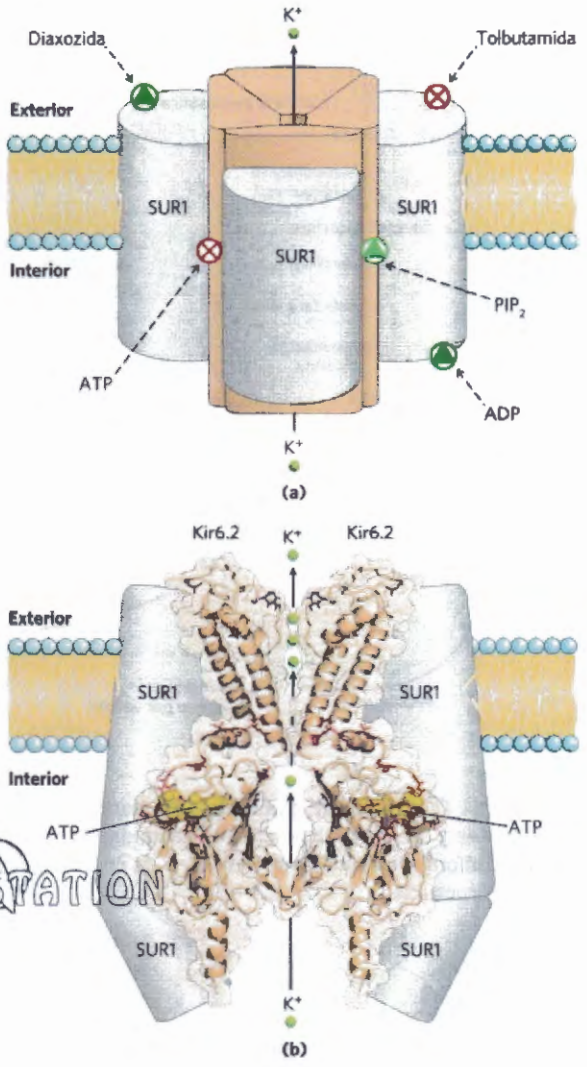


FIGURA 23-29 Canales de K+ controlados por ATP en las células β. **(a)** El canal de ATP regulado por voltaje visto en el plano de la membrana.. El canal está formado por cuatro subunidades Kir6.2 idénticas rodeado por cuatro subunidades SUR1 (receptor de la sulfonilurea). Las subunidades SUR1 tienen sitios de unión para el ADP y el medicamento diazoxide, que favorecen la apertura del canal, y tolbutamida, un fármaco de sulfonilurea que favorece el cierre del canal. Las subunidades Kir6.2 constituyen el propio canal y contienen, en el lado citosólico, sitios de unión de ATP y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PiP_2) que favorecen el cierre y la apertura del canal, respectivamente. **(b)** Estructura de la porción Kir6.2 del canal vista en el plano de la membrana. En aras de la claridad sólo se muestran dos dominios transmembrana y dos dominios citosólicos. Se muestran tres iones K^+ (verde) en la región del filtro de selectividad. La mutación de ciertos residuos aminoácidos (en rojo) provoca diabetes neonatal; la mutación de otros (azul) provoca hiperinsulinismo infantil. Esta estructura se obtuvo por mapeo de la secuencia conocida de Kir6.2 a las estructuras cristalinas del canal Kir bacteriano (KirBac1.1) y los dominios amino y carboxilo de otra proteína Kir, Kir3.1. Compare esta estructura con el canal regulado por K^+ de la Figura 11-46. [Fuente: (b) KirBac 1.1. PDB ID 1P7B, A. Kui et al., *Science* 300:1922, 2003; Kir3.1, PDB ID 1U4E, S. Pegan et al., *Nature Neurosci.* 8:279, 2005. Coordenadas cortesía de Frances M. Ashcroft, Oxford University, utilizadas con permiso de S. Haider y de M. S. P. Sansom para recrear un modelo publicado en J. F. Antcliff et al., *EMBO J.* 24:229, 2005.]

los hepatocitos, el glucagón hace posible que el hígado exporte glucosa restableciendo los valores normales de glucosa en sangre.

Aunque su diana principal es el hígado, el glucagón (al igual que la adrenalina) también afecta al tejido adiposo, donde activa la degradación de TAG al promover la fosforilación, dependiente de cAMP, de la perilipina y de la lipasa sensible a hormonas. La lipasa activada libera ácidos grasos libres, que se envían al hígado y a otros tejidos para ser utilizados como combustible, reservando así la glucosa para el cerebro. El efecto neto del glucagón es, pues, la estimulación de la síntesis de glucosa y su liberación por el hígado y la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo, para ser utilizados como combustible en lugar de la glucosa por tejidos distintos del cerebro. Todos estos efectos del glucagón están facilitados por la fosforilación de proteínas dependiente de cAMP.

Copy-STATION

TABLA 23-5 Efectos del glucagón sobre la glucosa sanguínea: producción y liberación de glucosa por el hígado

Efecto metabólico	Efecto sobre el metabolismo de la glucosa	Enzima diana
↑ Degradación del glucógeno (hígado)	Glucógeno ⟶ glucosa	↑ Glucógeno fosforilasa
↓ Síntesis del glucógeno (hígado)	Menos glucosa almacenada como glucógeno	↓ Glucógeno sintasa
↓ Glucólisis (hígado)	Menos glucosa utilizada como combustible en el hígado	↓ PFK-1
↑ Gluconeogénesis (hígado)	Aminoácidos, Glicerol, Oxalacetato ⟶ glucosa	↑ FBPasa-2 ↓ Piruvato quinasa ↑ PEP carboxiquinasa
↑ Movilización de ácidos grasos (tejido adiposo)	Menos glucosa utilizada como combustible en el hígado, músculo	↑ Lipasa sensible a hormonas ↑ PKA (perilipina-Ⓟ)
↑ Cetogénesis	Proporciona una alternativa a la glucosa como fuente de energía para el cerebro	↓ Acetil-CoA carboxilasa

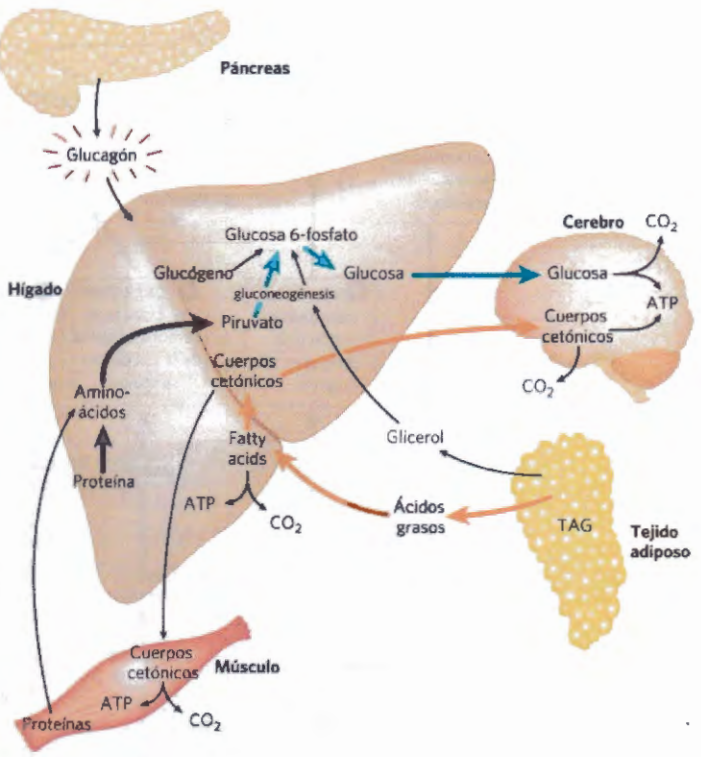


FIGURA 23-30 Estado de ayuno: el hígado glucogénico. Después de unas cuantas horas sin comer, el hígado se convierte en la principal fuente de glucosa para el cerebro. Se degrada el glucógeno hepático a glucosa 1-fosfato, esta se convierte en glucosa 6-fosfato y, a continuación, en glucosa libre, que se libera al torrente circulatorio. Los aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas en el hígado y en el músculo y el glicerol de la degradación de los TAG en el tejido adiposo se utilizan para la gluconeogénesis. El hígado utiliza ácidos grasos como combustible principal y el exceso de acetil-CoA se convierte en cuerpos cetónicos para su exportación como combustible a otros tejidos; el cerebro es especialmente dependiente de este combustible cuando el suministro de glucosa es escaso (véase la Fig. 23-23). (Las flechas azules marcan la ruta de la glucosa; las flechas naranja, la ruta de los lípidos y las flechas púrpura, la ruta de los aminoácidos).

Durante el ayuno y la inanición el metabolismo se modifica para proporcionar combustible para el cerebro

Las reservas energéticas de un ser humano adulto sano son de tres tipos: glucógeno almacenado en el hígado y, en cantidades menores, en el músculo, grandes cantidades de triacilgliceroles en el tejido adiposo y proteínas tisulares, que pueden degradarse en caso necesario para proporcionar combustible (Tabla 23-6).

COPY-STATION

A las dos horas después de una comida, el nivel de glucosa en sangre disminuye ligeramente y los tejidos reciben glucosa liberada del glucógeno hepático. No hay síntesis, o muy poca, de TAG. Unas cuatro horas después de la comida, la glucosa sanguínea ha continuado disminuyendo, la secreción de insulina se ha reducido y ha aumentado la secreción de glucagón. Estas señales hormonales movilizan TAG del tejido adiposo, que se convierten ahora en el combustible principal para el

TABLA 23-6 Disponibilidad de combustibles metabólicos en un hombre normal de 70 kg y en un hombre obeso de 140 kg en el inicio de un ayuno

Fuente energética	Peso (kg)	Equivalente calórico (miles de kcal (kJ))	Tiempo de supervivencia previsible (meses)[a]
Peso normal, hombre de 70 kg			
Triacilgliceroles (tejido adiposo)	15	140 (590)	
Proteínas (principalmente en músculo)	6	24 (100)	
Glucógeno (músculo, hígado)	0,23	0,90 (3,8)	
Combustibles en circulación (glucosa, ácidos grasos, triacilgliceroles, etc.)	0,023	0,10 (0,42)	
Total		165 (690)	3
Hombre obeso de 140 kg			
Triacilgliceroles (tejido adiposo)	80	750 (3.100)	
Proteínas (principalmente en músculo)	8	32 (130)	
Glucógeno (músculo, hígado)	0,23	0,92 (3,8)	
Combustibles en circulación	0,025	0,11 (0.46)	
Total		783 (3.200)	14

[a]El tiempo de supervivencia se ha calculado suponiendo un consumo basal de energía de 1.800 kcal/día.

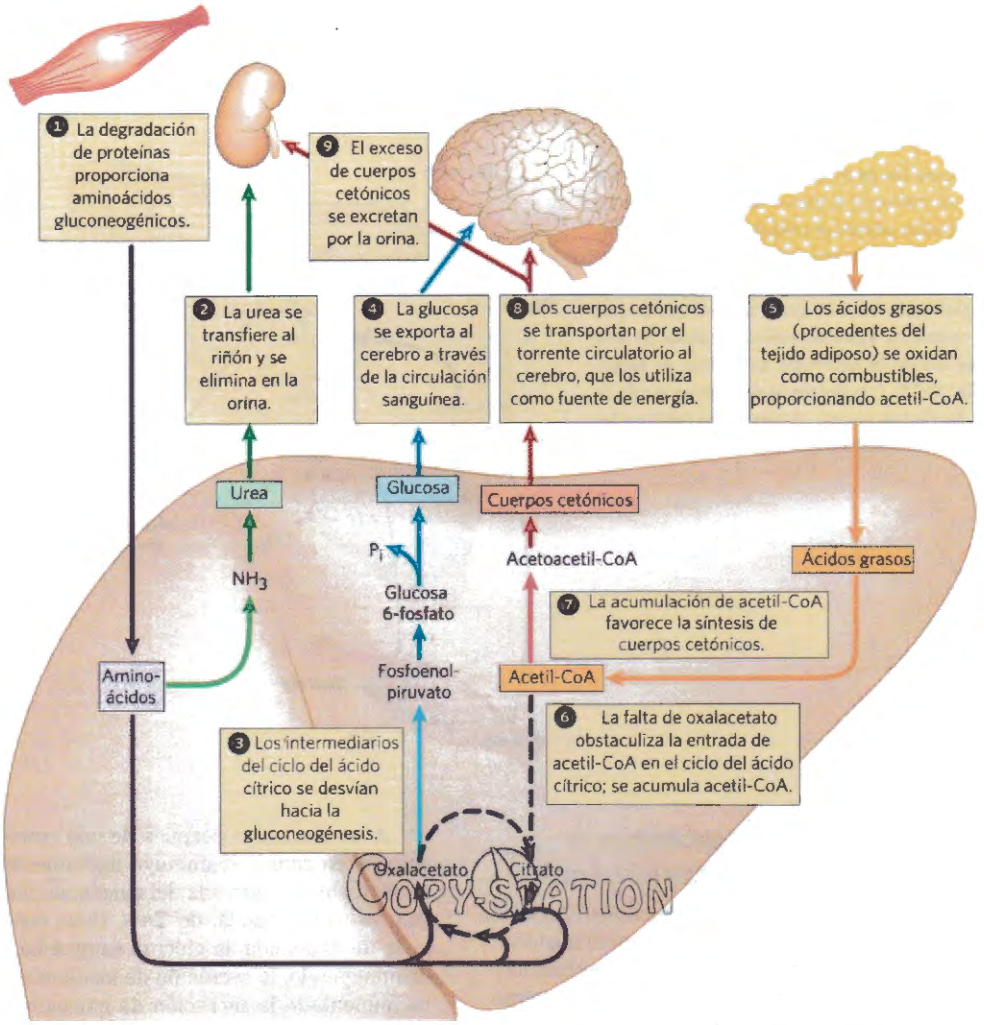


FIGURA 23-31 Metabolismo energético en el hígado durante el ayuno prolongado o en la diabetes mellitus descontrolada. Los pasos numerados se describen en el texto. Tras consumirse las reservas de glúcidos (glucógeno), la gluconeogénesis en el hígado se convierte en la fuente principal de glucosa para el cerebro (flechas azules). El NH_3 de la desaminación de aminoácidos se convierte en urea y se excreta (flechas verdes). Los aminoácidos glucogénicos procedentes de la degradación de proteínas (flechas púrpura) proporcionan sustratos para la gluconeogénesis y la glucosa se exporta al cerebro. Los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo se importan por el hígado y se oxidan a acetil-CoA (flechas naranja) siendo el acetil-CoA el material de partida para la formación de cuerpos cetónicos en el hígado que se exportan al cerebro en donde se utilizan como fuente principal de energía (flechas rojas). Cuando la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre excede la capacidad del riñón para reabsorber las cetonas, estos compuestos empiezan a aparecer en la orina.

músculo y el hígado. La **Figura 23-31** muestra las respuestas al ayuno prolongado. ❶ Para proporcionar glucosa al cerebro, el hígado degrada ciertas proteínas (las menos necesarias para un organismo que no ingiere comida). Sus aminoácidos no esenciales son transaminados o desaminados (Capítulo 18) y ❷ el exceso de grupos amino se convierte en urea que se exporta a través de la circulación sanguínea hasta el riñón, donde se excreta en la orina.

También en el hígado, y hasta cierto punto en los riñones, los esqueletos carbonados de los aminoácidos glucogénicos se convierten en piruvato o en intermediarios del ciclo del ácido cítrico. ❸ Estos intermediarios (así como el glicerol procedente de los TAG en el tejido adiposo proporcionan la materia prima para la gluconeogénesis en el hígado, ❹ que produce glucosa para el cerebro. ❺ Los ácidos grasos liberados del tejido adiposo se oxidan a acetil-CoA en el hígado, pero la utilización de intermediarios del ciclo del ácido cítrico para la gluconeogénesis agota el oxalacetato, ❻ se inhibe la entrada de acetil-CoA en el ciclo y se acumula acetil-CoA. ❼ Esto favorece la formación de acetoacetil-CoA y cuerpos cetónicos. Tras unos pocos días de ayuno, aumentan los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre **(Fig. 23-32)**, a medida que el hígado exporta estos combustibles al corazón, al músculo esquelético y al cerebro, que los usan en lugar de la glucosa (Fig. 23-31, ❽).

El acetil-CoA es un regulador crítico del destino del piruvato; inhibe alostéricamente la piruvato deshidrogenasa y estimula la piruvato carboxilasa. De esta forma, el acetil-CoA impide que continúe su propia producción a partir del piruvato, a la vez que estimula la conversión del piruvato en oxalacetato, primer paso de la gluconeogénesis.

Los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo de un adulto de peso normal podrían proporcionar

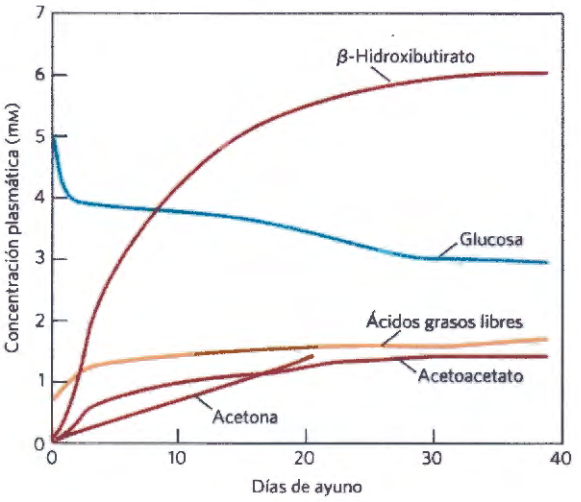


FIGURA 23-32 Concentración de ácidos grasos, glucosa y cuerpos cetónicos en el plasma durante seis semanas de inanición. A pesar de los mecanismos hormonales existentes para mantener el nivel de glucosa en sangre, éste empieza a disminuir a partir del segundo día de ayuno (azul). El nivel de cuerpos cetónicos, casi indetectable antes del ayuno, aumenta de forma espectacular después de 2 a 4 días de ayuno (rojo). Estas cetonas hidrosolubles, acetoacetato y β-hidroxibutirato, suplementan la glucosa como fuente de energía durante un ayuno prolongado. La acetona, un cuerpo cetónico minoritario, no se metaboliza sino que es eliminada en el aliento. También se produce un aumento, mucho menor, de ácidos grasos en la sangre(naranja), pero este incremento no contribuye al metabolismo energético del cerebro ya que los ácidos grasos no cruzan la barrera hemato-encefálica. [Datos de G. F. Cahill Jr., *Annu. Rev. Nutr.* 26:1, 2006, Fig. 2.]

suficiente energía para mantener una tasa basal del metabolismo durante unos tres meses; un adulto muy obeso puede tener suficiente energía almacenada para soportar un ayuno de más de un año (Tabla 23-6). Cuando se han agotado las reservas de grasa, empieza la degradación de proteínas *esenciales*, con la consiguiente pérdida de las funciones cardíaca y hepática y finalmente, en la inanición prolongada, la muerte. La grasa almacenada puede suministrar suficiente energía (calorías) durante el ayuno o una dieta estricta, pero es necesario un adecuado suministro de vitaminas y minerales así como suficientes aminoácidos glucogénicos para reemplazar a los que son usados para la gluconeogénesis. Las raciones de las personas sometidas a una dieta adelgazante se complementan normalmente con vitaminas, minerales y aminoácidos o proteínas.

La adrenalina es la señal de una actividad inminente

Cuando un animal se enfrenta a una situación de tensión que requiere un aumento de actividad, para la lucha o para la huída en casos extremos, señales neuronales que parten del cerebro desencadenan la liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula suprarrenal. Ambas hormonas dilatan las vías respiratorias para facilitar la captación de O_2, incrementan la frecuencia e intensidad de los latidos cardíacos y aumentan la presión sanguínea, promoviendo en consecuencia el flujo de O_2 y de combustibles a los tejidos (Tabla 23-7). Esta es la respuesta "luchar o volar" (luchar o huir).

La adrenalina actúa principalmente sobre el músculo y los tejidos adiposo y hepático. Activa la glucógeno fosforilasa e inactiva la glucógeno sintasa por fosforilación dependiente de cAMP de los enzimas, estimulando de esta forma la conversión del glucógeno *hepático* en glucosa sanguínea, el combustible para el trabajo muscular anaeróbico. La adrenalina también estimula la degradación anaeróbica del glucógeno del *músculo* por fermentación hasta ácido láctico, estimulando la formación glucolítica de ATP. La estimulación de la glucólisis se consigue aumentando la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, un activador alostérico potente del enzima glucolítico clave, la fosfofructoquinasa-1. La adrenalina también estimula la movilización de grasas en el tejido adiposo, activando la lipasa sensible a hormonas y desplazando la perilipina (véase la Fig. 17-3). Finalmente, la adrenalina estimula la secreción de glucagón e inhibe la secreción de insulina, reforzando así su efecto movilizador de combustibles y frenando su almacenamiento.

TABLA 23-7 Efectos fisiológicos y metabólicos de la adrenalina: preparación para la acción

Efecto inmediato	Efecto global
Fisiológicos	
↑ Frecuencia cardíaca ↑ Presión sanguínea ↑ Dilatación de los conductos respiratorios	Aumento del suministro de O_2 a los tejidos (músculo)
Metabólicos	
↑ Degradación de glucógeno (músculo, hígado) ↓ Síntesis de glucógeno (músculo, hígado) ↑ Gluconeogénesis (hígado)	Aumento de la producción de glucosa para su utilización como combustible
↑ Glucólisis (músculo)	Aumento de la producción de ATP en el músculo
↑ Movilización de ácidos grasos (tejido adiposo)	Aumento de la disponibilidad de ácidos grasos como combustibles
↑ Secreción de glucagón ↓ Secreción de insulina	Refuerzo de los efectos metabólicos de la adrenalina

El cortisol es un indicador de estrés, incluidos los bajos niveles de glucosa en sangre

Una amplia variedad de agentes estresantes (ansiedad, miedo, dolor, hemorragia, infecciones, bajo nivel de glucosa en sangre, inanición) estimulan la liberación de la hormona corticosteroide **cortisol** por la corteza suprarrenal. El cortisol actúa sobre el músculo, el hígado y el tejido adiposo para suministrar al organismo el combustible necesario para afrontar el estrés. El cortisol es una hormona de acción relativamente lenta que altera el metabolismo cambiando los tipos y las cantidades de ciertos enzimas sintetizados en sus células diana, en lugar de regular la actividad de moléculas enzimáticas ya existentes.

En el tejido adiposo, el cortisol provoca un aumento de la liberación de ácidos grasos de los TAG de reserva. Los ácidos grasos se exportan para ser utilizados como combustible por otros tejidos, y el glicerol se utiliza para la gluconeogénesis en el hígado. El cortisol estimula la degradación de proteínas musculares no esenciales y la exportación de aminoácidos al hígado, donde sirven de precursores para la gluconeogénesis. En el hígado, el cortisol estimula la gluconeogénesis al promover la síntesis de la PEP carboxiquinasa; el glucagón tiene el mismo efecto, mientras que la insulina tiene el efecto contrario. La glucosa producida por esta vía se almacena en el hígado en forma de glucógeno o se exporta inmediatamente a los tejidos que necesitan glucosa como combustible. El efecto neto de estos cambios metabólicos es restablecer los niveles normales de glucosa en sangre y almacenar glucógeno para favorecer la respuesta de lucha o de huída normalmente asociada al estrés. Los efectos del cortisol, por lo tanto, contrarrestan los de la insulina. Durante largos períodos de estrés, la liberación continuada de cortisol pierde su valor adaptativo positivo y empieza a causar daños al músculo y al hueso y a perjudicar las funciones inmunes y endocrinas.

La enfermedad de Cushing es un estado médico en el que se produce un exceso de cortisol debido a un tumor de la hipófisis. Se trata quirúrgicamente para eliminar el tumor, seguido de quimioterapia para matar las células tumorales restantes. La enfermedad de Addison es el resultado de una producción reducida de cortisol y se trata administrando hidrocortisona (nombre farmacéutico del cortisol).

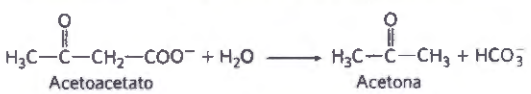
La diabetes mellitus es un defecto en la producción o en la acción de la insulina

La **diabetes mellitus** es una enfermedad relativamente común: alrededor de un 9% de la población de los Estados Unidos y casi el 25% de la poblaci´çon de Estados Unidos de más de 65 años muestra algún grado de anomalía en el metabolismo de la glucosa, indicativa de diabetes o de una tendencia a padecerla. Hay dos formas clínicas principales de diabetes mellitus: **diabetes tipo 1,** a veces denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y **diabetes tipo 2,** o diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), también denominada diabetes resistente a la insulina.

La diabetes tipo 1 aparece normalmente de forma temprana y sus síntomas se agravan rápidamente. Esta enfermedad responde a la inyección de insulina, porque el defecto metabólico procede de una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y la consiguiente incapacidad de producir suficiente insulina. La diabetes tipo 1 requiere una terapia basada en la administración de insulina y en un cuidadoso control de por vida del equilibrio entre la ingestión de glucosa y la dosis de insulina. Síntomas característicos de la diabetes tipo 1 (y del tipo 2) son la sed excesiva y la micción frecuente (poliuria), que provocan la ingestión de grandes cantidades de agua (polidipsia) ("diabetes mellitus" significa "excreción excesiva de orina dulce"). Estos síntomas se deben a la excreción de grandes cantidades de glucosa en la orina, situación conocida como **glucosuria**.

La diabetes tipo 2 es de desarrollo lento (típicamente en individuos mayores y obesos), y los síntomas son menos graves y, a menudo, pasa desapercibida al principio. En realidad, éste es un grupo de enfermedades en el que la actividad reguladora de la insulina es defectuosa: se produce insulina, pero alguna característica del sistema de respuesta a la insulina es defectuosa. Estos individuos son insulino-resistentes. La conexión entre la diabetes tipo 2 y la obesidad (discutida más adelante) constituye un área de investigación muy dinámica.

Los individuos con cualquiera de los dos tipos de diabetes son incapaces de captar eficientemente la glucosa de la sangre; recuérdese que la insulina provoca el desplazamiento de los transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática del músculo y del tejido adiposo (véase la Fig. 12-20). Dada la falta de glucosa en las células los ácidos grasos se convierten en el combustible principal, lo que lleva a otro cambio metabólico característico en la diabetes: la oxidación excesiva pero incompleta de los ácidos grasos en el hígado. El acetil-CoA producido por la β-oxidación no puede ser oxidado completamente por el ciclo del ácido cítrico, ya que la elevada proporción [NADH]/[NAD^+] producida por la β-oxidación inhibe el ciclo (recuérdese que hay tres pasos del ciclo que convierten el NAD^+ en NADH). La acumulación de acetil-CoA ocasiona una sobreproducción de los cuerpos cetónicos, acetoacetato y β-hidroxibutirato, que no pueden ser utilizados por los tejidos extrahepáticos tan deprisa como los produce el hígado. Además de β-hidroxibutirato y acetoacetato, la sangre de los diabéticos también contiene acetona, resultado de la descarboxilación espontánea del acetoacetato:



La acetona es volátil y se exhala, dando un olor característico al aliento de un diabético no controlado, a veces confundido con el etanol. Un diabético que muestra confusión mental debido a los niveles muy elevados de glucosa en sangre puede recibir ocasionalmente un diagnóstico de etilismo, un error que puede resultar fatal. La sobreproducción de cuerpos cetónicos, denominada **cetosis**, se manifiesta por un gran aumento en las concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre (cetonemia) y en orina (cetonuria).

Los cuerpos cetónicos son ácidos carboxílicos que se ionizan liberando protones. En la diabetes no contro-

Copy-Station

lada esta producción de ácidos puede rebasar la capacidad amortiguadora del sistema del bicarbonato de la sangre y producir una disminución del pH sanguíneo, denominada **acidosis**, o en combinación con la cetosis, **cetoacidosis**, una situación potencialmente peligrosa para la vida.

Los análisis bioquímicos de muestras de sangre y de orina son esenciales para el diagnóstico y el tratamiento de la diabetes. Un criterio diagnóstico sensible lo constituye la **prueba de tolerancia a la glucosa.** Después de una noche sin ingerir alimentos, el paciente bebe una dosis de 100 g de glucosa disuelta en un vaso de agua. Se mide la concentración de glucosa en sangre antes del ensayo y a intervalos de 30 minutos durante varias horas después de la ingestión. Un individuo sano asimila la glucosa rápidamente y los niveles de glucosa en sangre no aumentan más allá de 9 o 10 mM; en la orina no aparece glucosa o muy poca. Los individuos diabéticos muestran una marcada deficiencia en la asimilación de la dosis de glucosa; sus niveles de glucosa en sangre aumentan espectacularmente y vuelven al nivel de ayuno muy lentamente. Dado que los niveles de glucosa sanguínea están por encima del umbral renal (alrededor de 10 mM), también aparece glucosa en la orina.

RESUMEN 23.3 Regulación hormonal del metabolismo energético

- La concentración de glucosa en sangre está controlada por hormonas. Las fluctuaciones en la glucosa sanguínea (que normalmente se encuentra entre 70 y 100 mg/100 mL, o alrededor de 4,5 mM), debidas a la ingestión de alimentos o al ejercicio intenso, se compensan con una serie de cambios inducidos por hormonas en el metabolismo de varios órganos.
- Los niveles elevados de glucosa en sangre provocan la liberación de insulina, que acelera la captación de glucosa por los tejidos y favorece el almacenamiento de combustibles en forma de glucógeno y triacilgliceroles, a la vez que inhibe la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo.
- Unos niveles de glucosa en sangre reducidos provocan la liberación de glucagón, que estimula la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático y desvía el metabolismo energético en el hígado y el músculo hacia la oxidación de ácidos grasos, reservando la glucosa para su utilización por el cerebro. Durante el ayuno prolongado los TAG se convierten en la principal fuente de energía; el hígado transforma los ácidos grasos en cuerpos cetónicos que se exportan a otros tejidos, entre ellos el cerebro.
- La adrenalina prepara el organismo para un aumento de actividad, movilizando glucosa a partir de glucógeno y otros precursores y liberándola a la sangre.
- El cortisol, liberado en respuesta a diversos agentes estresantes (entre ellos una baja glucosa sanguínea), estimula la gluconeogénesis en el hígado a partir de aminoácidos y glicerol, lo que tiene como consecuencia el aumento de la glucosa sanguínea, en oposición al efecto de la insulina.
- En la diabetes, la insulina o no es producida o no es reconocida por los tejidos, de forma que se hace difícil la captación de la glucosa. Cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, se excreta glucosa. Los tejidos pasan a depender entonces de los ácidos grasos como combustible (produciendo cuerpos cetónicos) y degradan proteínas celulares para fabricar glucosa a partir de los aminoácidos glucogénicos. La diabetes no controlada se caracteriza por niveles elevados de glucosa en la sangre y en la orina y por la producción y excreción de cuerpos cetónicos.

23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal

En la población de los Estados Unidos, el 35% de los adultos son obesos mientras que un 35% adicional tienen sobrepeso, de acuerdo con el **índice de masa corporal (IMC)**, calculado como peso en kg/(altura en m)^2. Un IMC por debajo de 25 se considera normal; un individuo con un IMC de 25 a 30 tiene sobrepeso; un IMC superior a 30 indica **obesidad**. La obesidad constituye un peligro para la vida. Aumenta significativamente las probabilidades de padecer diabetes tipo 2, así como ataques de corazón, embolias y cánceres del colon, mama, próstata y endometrio. En consecuencia, existe un gran interés en conocer de qué modo se regulan la masa corporal y el almacenamiento de grasas en el tejido adiposo.

En una primera aproximación, la obesidad es el resultado de ingerir más calorías en la dieta que las utilizadas en las actividades corporales que consumen energía. El cuerpo puede afrontar un exceso de calorías de la dieta de tres maneras: (1) convertir el exceso de combustible en grasa y almacenarla en el tejido adiposo, (2) quemar el exceso de combustible mediante ejercicio extra y (3) "malgastar" el combustible desviándolo hacia la producción de calor (termogénesis) en mitocondrias desacopladas. En los mamíferos actúa un conjunto complejo de señales hormonales y neuronales para mantener el equilibrio entre la ingestión de combustible y el gasto energético, con objeto de mantener la cantidad de tejido adiposo dentro de unos límites adecuados. Para tratar la obesidad de forma efectiva es necesario comprender los diferentes controles y equilibrios en condiciones normales y por qué fallan estos mecanismos homeostáticos en la obesidad.

El tejido adiposo tiene importantes funciones endocrinas

Una primera hipótesis para explicar la homeostasis de la masa corporal, el modelo de "retroalimentación negativa de la obesidad", postulaba la existencia de un mecanismo que inhibiría el apetito e incrementaría el consumo de energía cuando el peso corporal superase un cierto valor, el valor de referencia; la inhibición se levantaría cuando el peso corporal descendiese por debajo del valor de referencia **(Fig. 23-33)**. Esta teoría predice que una señal retroalimentadora procedente del tejido adiposo influye en los centros cerebrales que controlan el apetito y la actividad metabólica y motora. El primer factor de este tipo, la leptina, se descubrió en 1994 y, posteriormente, se ha puesto de manifiesto que el tejido adiposo es un importante órgano endocrino que produce hormonas peptídicas, conocidas como **adipoquinas**. Las adipoquinas pueden actuar localmente (acción autocrina y paracrina) o sistémicamente (acción endocrina), como transportadoras de información acer-



FIGURA 23-33 Modelo del valor de referencia para el mantenimiento de una masa constante. Cuando aumenta la masa del tejido adiposo (contorno de trazos), la leptina liberada inhibe el hambre y la síntesis de grasas y estimula la oxidación de ácidos grasos. Cuando disminuye la masa de tejido adiposo (contorno continuo), una producción menor de leptina favorece una ingesta mayor y una menor oxidación de ácidos grasos.



FIGURA 23-34 Un defecto en la producción de leptina causa obesidad. Los dos ratones, de la misma edad, tienen defectos en el gen *OB*. Al ratón de la derecha se le administró leptina purificada mediante una inyección diaria y pesa 35 g. El ratón de la izquierda no recibió leptina, y como consecuencia comió más y fue menos activo; pesa 67 g. [Fuente: The Rockefeller University/AP Photp.]

ca de la idoniedad de las reservas energéticas (TAG) almacenadas en el tejido adiposo para otros tejidos y el cerebro. Normalmente, las adipoquinas provocan cambios en el metabolismo energético y el comportamiento alimenticio que mantienen las reservas energéticas adecuadas y la masa corporal. La sobre– o subproducción de adipoquinas y la desregulación resultante pueden poner en peligro la vida.

La **leptina** (del griego *leptos*, delgado) es una proteína pequeña (167 aminoácidos) que al llegar al cerebro actúa sobre los receptores del hipotálamo que moderan el apetito. La leptina fue identificada originalmente como el producto del gen denominado *OB* (obeso) en ratones de laboratorio. Los ratones con dos copias defectuosas de este gen (genotipo *ob/ob*; las letras minúsculas indican una forma mutante del gen) muestran el comportamiento y la fisiología de animales en situación de ayuno permanente: sus niveles plasmáticos de cortisol son elevados, son incapaces de permanecer calientes, crecen anormalmente, muestran un apetito ilimitado y no se reproducen. Como consecuencia de este último efecto se convierten en gravemente obesos, con un peso hasta tres veces superior al de un ratón normal **(Fig. 23-34)**. También tienen desarreglos metabólicos similares a los de los animales diabéticos, y son resistentes a la insulina. Cuando se les inyecta leptina los ratones *ob/ob*, pierden peso y aumentan su actividad locomotora y la termogénesis.

En los ratones se ha encontrado un segundo gen, designado *DB* (diabético), que también tiene un papel en la regulación del apetito. Los ratones con dos copias defectuosas (*db/db*) son obesos y diabéticos. El gen *DB* codifica el **receptor de leptina.** Cuando el recep-

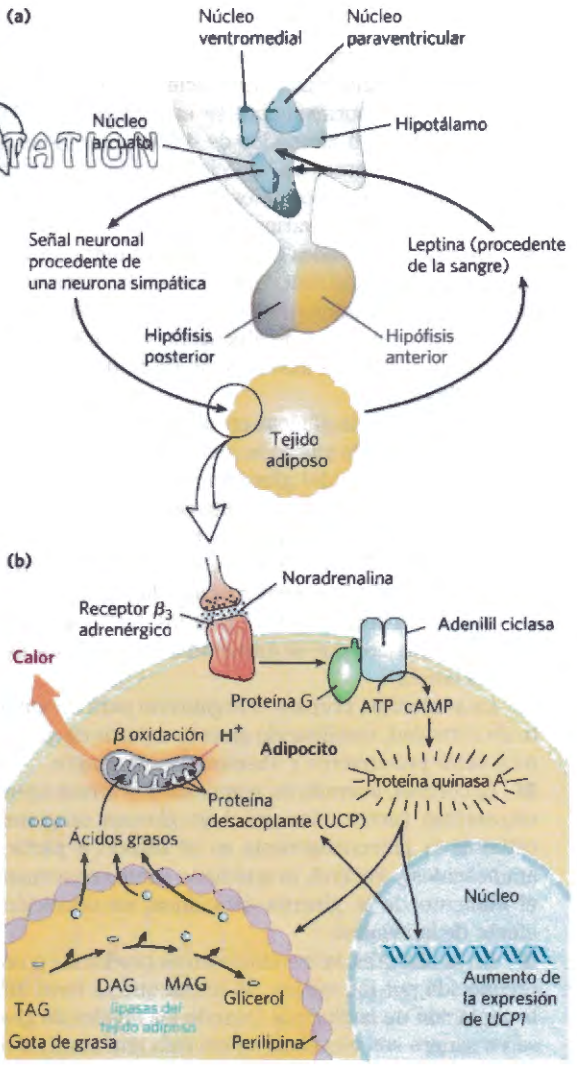


FIGURA 23-35 Regulación hipotalámica de la ingesta y gasto energético. (a) Papel del hipotálamo y su interacción con el tejido adiposo. El hipotálamo recibe una información (leptina) del tejido adiposo y responde con señales neuronales para los adipocitos. **(b)** Esta señal (noradrenalina) activa la proteína quinasa A que desencadena la movilización de ácidos grasos de los TAG y su oxidación desacoplada en la mitocondria con la consiguiente generación de calor pero no de ATP. DAG, diacilglicerol; MAG, monoacilglicerol.

tor es defectuoso, se pierde la función señalizadora de la leptina.

El receptor de leptina se expresa principalmente en las regiones del cerebro que regulan el comportamiento alimenticio (las neuronas del **núcleo arcuato** del hipotálamo **(Fig. 23-35a)**. La leptina vehicula el mensaje de que las reservas de grasa son suficientes y promueve una disminución de la ingestión de alimentos y un aumento del gasto energético. La interacción de la leptina con su receptor en el hipotálamo altera la emisión de señales neuronales a la región del cerebro que afecta al apetito. La leptina también estimula al sistema nervioso simpático, aumentando la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y la termogénesis mediante el desacoplamiento de las mitocondrias de los adipocitos marrones (Fig. 23-35b). Recuerde que la proteína desacoplante o UCP1, forma un canal en la membrana mitocondrial interna que permite que los protones entren de nuevo en la matriz mitocondrial sin pasar a través del complejo de la ATP sintasa. Ello permite la oxidación continua de combustible (ácidos grasos en un adipocito marrón o beige) sin síntesis de ATP, disipando la energía en forma de calor y consumiendo calorías de la dieta o grasas almacenadas en cantidades potencialmente muy grandes.

La leptina estimula la producción de hormonas peptídicas anorexigénicas

Dos tipos de neuronas del núcleo arcuato controlan la ingestión y el metabolismo de los combustibles **(Fig. 23-36)**. Las neuronas **orexigénicas** (estimuladoras del apetito) estimulan el apetito, produciendo y liberando el **neuropéptido Y (NPY),** que hace que la siguiente neurona del circuito envíe al cerebro la señal ¡Come! El nivel sanguíneo de NPY aumenta durante la inanición, y está elevado en los ratones *ob/ob* y *db/db*. La elevada concentración de NPY probablemente sea la causa de la obesidad de estos ratones, que comen de forma voraz.

Las neuronas **anorexigénicas** (supresoras del apetito) del núcleo arcuato producen la **hormona estimuladora de los α-melanocitos** (**α-MSH**; también conocida como melanocortina), formada a partir de su precursor polipeptídico proopiomelanocortina (POMC; Fig. 23-5). La liberación de α-MSH hace que la siguiente neurona del circuito envíe al cerebro la señal, ¡Para de comer!

La cantidad de leptina liberada por el tejido adiposo depende tanto del número como del tamaño de los adipocitos. Cuando la pérdida de peso disminuye la masa de tejido graso, bajan los niveles de leptina en sangre, aumenta la producción de NPY y se invierten los procesos del tejido adiposo mostrados en la Figura 23-35. Disminuye el desacoplamiento, que enlentece la termogénesis, se ahorra combustible y la movilización de grasas es también más lenta en respuesta a una reducción en la señalización por cAMP. El consumo de más alimento combinado con una utilización más eficiente del combustible da lugar a una recuperación de la reserva de grasa en el tejido adiposo, que devuelve el sistema al equilibrio.

La leptina también puede ser esencial para el desarrollo normal de los circuitos neuronales del hipotálamo. En los ratones, el crecimiento de las fibras nerviosas desde el núcleo arcuato durante el desarrollo cerebral temprano es más lento en ausencia de leptina; se ven afectadas tanto las señales orexigénicas como (en menor medida) las anorexigénicas emitidas por el hipotálamo. Es posible que los niveles de leptina *durante el desarrollo* de estos circuitos determinen los detalles de las conexiones de este sistema de regulación.

CamScanner

La leptina desencadena una cascada de señalización que regula la expresión génica

La señal de la leptina se transduce mediante un mecanismo usado también por los receptores del interferón y de los factores de crecimiento, denominado sistema JAK-STAT **(Fig. 23-37)**. El receptor de la leptina que

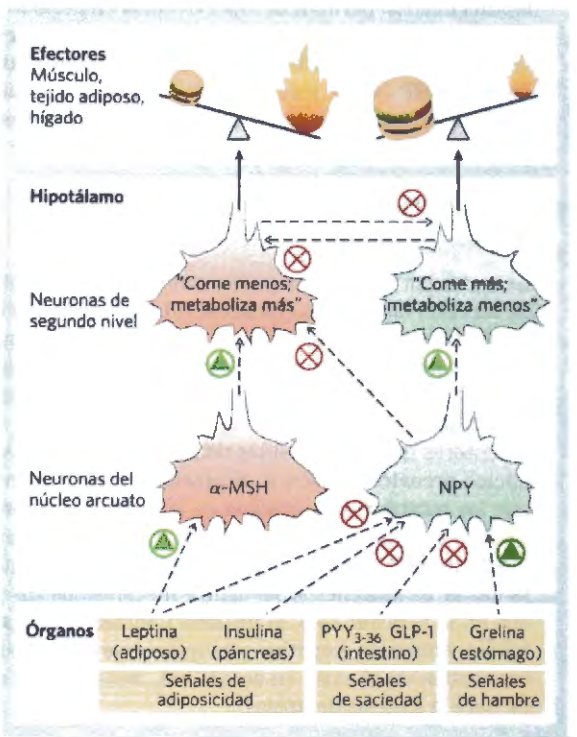


FIGURA 23-36 Hormonas que controlan la ingesta. En el núcleo arcuato del hipotálamo, dos conjuntos de células neurosecretoras reciben información hormonal y transmiten señales neuronales a las células de los tejidos muscular, adiposo y hepático. La leptina y la insulina se liberan del tejido adiposo y del páncreas, respectivamente, en proporción a la masa de grasa corporal. Las dos hormonas actúan sobre células neurosecretoras anorexigénicas para provocar la liberación de α-MSH (hormona estimulante de los melanocitos); la α-MSH transporta la señal a neuronas de segundo orden del hipotálamo que desconectan la señales para comer menos y metabolizar más combustible. La leptina y la insulina también actúan sobre células neurosecretoras orexigénicas para inhibir la liberación de NPY, reduciendo la señal "comer más" enviada a los tejidos. Tal como se describe más adelante en el texto, la hormona gástrica grelina *estimula* el apetito por activación de las células que expresan NPY; PYY_{3-36}, liberado en el colon, *inhibe* estas neuronas y de esta forma disminuye el apetito. Cada uno de los dos tipos de células neurosecretoras inhibe la producción hormonal por el otro tipo, de modo que cualquier estímulo que active las células orexigénicas inactiva las células anorexigénicas, y viceversa. Esto refuerza el efecto de las señales estimuladoras.

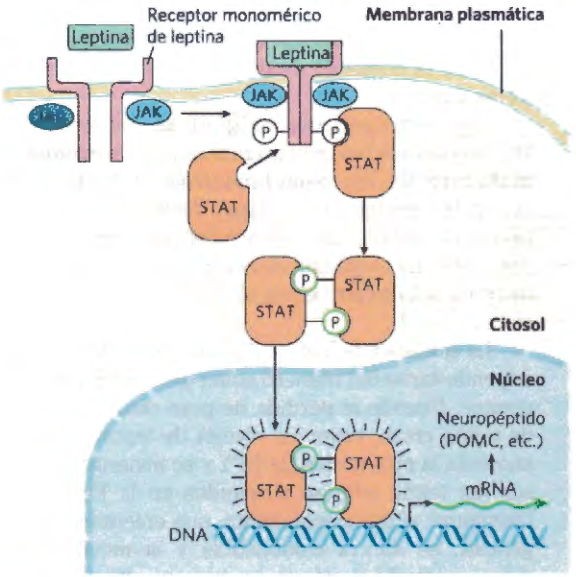


FIGURA 23-37 Mecanismo JAK-STAT de transducción de la señal de la leptina en el hipotálamo. La unión de la leptina induce la dimerización del receptor de leptina, seguida de la fosforilación de residuos Tyr específicos del dominio citosólicodel receptor, catalizada por la Janus quinasa (JAK). Las STAT, que se unen al receptor fosforilado de leptina se fosforilan a continuación en residuos Tyr por una actividad separada de JAK. Las STAT dimerizan por interacción recíproca con los residuos de Ⓟ-Tyr y entran en el núcleo donde se unen a secuencias reguladoras específicas del DNA y modifican la expresión de ciertos genes. Finalmente, los productos de estos genes influyen en el comportamiento alimenticio y en el gasto energético del organismo. [Fuente: Información de J. Auwerx y B. Staels, *Lancet*, 351:737, 1998, Fig. 2.]

tiene un solo segmento transmembrana, dimeriza cuando la leptina se une a los dominios extracelulares de dos monómeros. Ambos monómeros se fosforilan en un residuo Tyr del dominio intracelular por una **Janus quinasa (JAK).** Los residuos Ⓟ-Tyr se convierten en los sitios de unión de tres proteínas de *t*ransducción de *s*eñales y *a*ctivadoras de la *t*ranscripción (**STAT** 3, 5 y 6, a veces llamados fat-STAT). Una vez unidos, los STAT se fosforilan en residuos Tyr por la misma JAK. Después de la fosforilación, los STAT dimerizan y, a continuación, se trasladan al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de DNA y estimulan la expresión de genes diana, entre ellos el gen de la POMC, a partir del cual se obtiene la α-MSH.

El aumento del catabolismo y la termogénesis desencadenados por la leptina se debe, en parte, al aumento de la síntesis de mitocondrias en los adipocitos marrones y beige. La leptina estimula la síntesis de UCP1 al alterar las transmisiones sinápticas de las neuronas del núcleo arcuato al tejido adiposo y a otros tejidos a través del sistema nervioso simpático. En estos tejidos la leptina provoca un aumento de la liberación de noradrenalina que actúa a través de los receptores β_3-adrenérgicos para estimular la transcripción del gen *UCP1*. El desacoplamiento resultante entre la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa consume grasa y es termogénico (Fig. 23-35).

¿Podría ser la obesidad humana consecuencia de una producción insuficiente de leptina y, por tanto, ser tratable por inyección de leptina? Los niveles sanguíneos de leptina son de hecho mucho *más altos* en animales obesos (incluidos los humanos) que en los animales de masa corporal normal (excepto, claro está, en los mutantes *ob/ob*, que no pueden producir leptina). Algún elemento en el sistema de respuesta de la leptina debe ser defectuoso en los individuos obesos y el aumento de leptina es el resultado de un intento (fallido) de superar la resistencia a la leptina. En los casos excepcionales de extrema obesidad en humanos, que tienen un gen de la leptina defectuoso *(OB)*, la inyección de leptina ha tenido como resultado una notable pérdida de peso. Sin embargo, en la inmensa mayoría de individuos obesos, el gen *OB* está intacto. En pruebas clínicas, la inyección de leptina no tuvo el efecto de pérdida de peso observada en los ratones obesos *ob/ob*. Es evidente que en la mayor parte de casos de obesidad humana intervienen otros factores además de la leptina.

El sistema de la leptina puede haber evolucionado para regular la respuesta a la inanición

El sistema de la leptina probablemente haya evolucionado para ajustar la actividad y el metabolismo del animal durante los períodos de ayuno e inanición, no como un medio de prevenir el aumento de peso. La *reducción* del nivel de leptina desencadenada por la deficiencia nutricional invierte los procesos termogénicos ilustrados en la Figura 23-35, lo que permite la conservación de combustible. En el hipotálamo un descenso en la señal de leptina también provoca la disminución de la producción de hormona tiroidea (que reduce el metabolismo basal), la disminución de la producción de hormonas sexuales (que impide la reproducción) y un aumento de la producción de glucocorticoides (que moviliza las reservas corporales generadoras de combustible). Al minimizar el gasto energético y maximizar el uso de las reservas de energía endógenas, estas respuestas en las que interviene la leptina pueden permitir la supervivencia en períodos de privación nutricional severa. En el hígado y el músculo, la leptina activa **AMPK,** la **proteína quinasa activada por AMP** (véase más adelante), que inhibe la síntesis de ácidos grasos y activa su oxidación, favoreciendo los procesos de generación de energía.

La insulina también actúa en el núcleo arcuato para regular la ingesta y la conservación de energía

La secreción de insulina puede reflejar tanto el tamaño de las reservas de grasa (adiposidad) como el equilibrio energético momentáneo (nivel de glucosa en sangre). Además de sus acciones endocrinas en diversos tejidos la insulina actúa sobre el sistema nervioso central (en el hipotálamo) inhibiendo el apetito (Fig. 23-36). Los receptores de insulina en las neuronas orexigénicas del núcleo arcuato *inhiben* la liberación de NPY mientras que los receptores de insulina en las neuronas anorexigénicas *estimulan* la producción de α-MSH, disminuyendo de este modo la ingesta energética e incrementando la termogénesis. Mediante mecanismos discutidos en la Sección 23.3, la insulina también indica a los tejidos muscular, hepático y adiposo que aumenten la conversión de glucosa en acetil-CoA, material de partida para la síntesis de grasas.

COPY-STATION

La adiponectina actúa a través de la AMPK para aumentar la respuesta a la insulina

La **adiponectina** es una hormona peptídica producida casi exclusivamente por el tejido adiposo. Se trata de una adipoquina que sensibiliza otros órganos frente a los efectos de la insulina. La adiponectina circula por la sangre y afecta el metabolismo de los ácidos grasos y de los glúcidos en el hígado y el músculo. Aumenta la captación de ácidos grasos de la sangre por los miocitos y la velocidad a la que experimentan la β-oxidación en el músculo. También bloquea la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis en los hepatocitos y estimula la captación y el catabolismo de la glucosa en el músculo y el hígado.

Estos efectos de la adiponectina son indirectos y no totalmente comprendidos, pero en muchos casos interviene claramente la AMPK. La adiponectina provoca la fosforilación y la activación de la AMPK, actuando a través de su GPGR. Recuérdese que la AMPK se activa mediante factores que indican la conveniencia de desplazar el metabolismo a favor de la producción de energía y en detrimento de las biosíntesis (**Fig. 23-38**; véanse también las pp. 582-583). Cuando está activada, la AMPK afecta profundamente el metabolismo de las células individuales y, a través de sus acciones sobre el cerebro, el metabolismo del animal entero.

La AMPK coordina catabolismo y anabolismo en respuesta al estrés metabólico

La AMPK se ha convertido en un actor principal en la coordinación de las rutas metabólicas, en la actividad del organismo y en el comportamiento alimentario (**Fig. 23-39**). Esta proteína quinasa activada por AMP monitoriza el status energético y de nutrición *en células individuales* y desplaza el metabolismo hacia la generación de energía cuando es necesario para mantener la homeostasis metabólica. Además, al responder a una serie de señales hormonales, la AMPK actúa en el hipotálamo para mantener el *organismo entero* en equilibrio energético (Fig. 23-12).

La AMPK sigue el status energético de una célula a través de su respuesta a la [AMP]. Muchas de las reacciones que consumen energía en las células convierten el ATP en ADP o AMP. La adenilato quinasa cataliza la reacción 2ADP ⟶ AMP + ATP, por lo que la [AMP] es una medida sensible del status energético de la célula (véase la Tabla 15-4). La unión de AMP activa alostéricamente la AMPK mientras que el ATP impide la unión de AMP, por lo que se activa el enzima cuando la célula está mermada de energía (elevada [AMP]) y se inactiva cuando rebosa de energía (elevada [ATP] y alta [ATP]/[AMP]). La AMPK responde a las necesidades energéticas del organismo entero mediante un segundo modo de regulación. El enzima se activa en un factor de 100 por fosforilación de La Thr^{172} por la quinasa B1 hepática (LKB1), que es, a su vez, regulada por componentes precedentes de la vía, incluida la adiponectina. Cuando se activa por fosforilación y unión de AMP, la AMPK fosforila enzimas específicos de rutas metabólicas cruciales para la homeostasis energética.

Cuando la AMPK detecta la carencia de ATP en una célula individual, se inhibe la síntesis de lípidos y se estimula la utilización de lípidos como combustible. La acetil-CoA carboxilasa, que produce malonil-CoA, primer intermediario comprometido en la síntesis de ácidos grasos, es uno de los enzimas regulados por la AMPK en el hígado y en el tejido adiposo. El malonil-CoA es un potente inhibidor del enzima carnitina aciltransferasa I, que inicia el proceso de la β-oxidación al transportar ácidos grasos al interior de la mitocondria (véase la Fig. 17-6). Al fosforilar e inactivar la acil-CoA carboxilasa, la AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos al tiempo que libera la inhibición (por el malonil-CoA) de la β-oxidación (Fig. 17-13). La síntesis de colesterol, que consume mucha energía, también es inhibida por la AMPK, que fosforila e inactiva la HMG-CoA reductasa (véase la Fig. 21-34). De modo parecido, la AMPK inhibe la ácido graso sintasa y la acil transferasa, bloqueando de manera efectiva la síntesis de TAG. Además de estos efectos sobre el metabolismo lipídico, la AMPK inhibe la síntesis de glucógeno y de proteína (Fig. 23-39). Un suministro inadecuado de oxígeno (hipoxia) o de glucosa sanguínea (hipoglucemia) son algunos de los agentes estresantes que desencadenan la activación de la AMPK.

En el hipotálamo, la AMPK puede recibir diversas señales de todo el cuerpo (Fig. 23-12). La grelina y la adiponectina indican "estómago vacío" y "tejido mermado de grasas" y, al igual que la baja glucosa sanguínea, desencadenan señales hipotalámicas, a través de la AMPK, que estimulan la ingestión de alimentos y la inhibición de procesos biosintéticos que requieren ener-

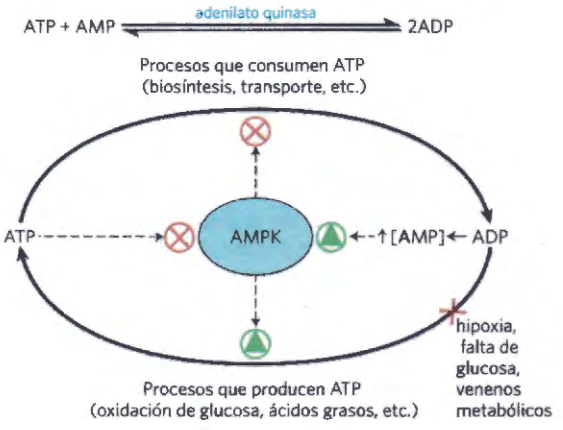


FIGURA 23-38 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el mantenimiento de la homeostasis energética. El ADP producido por las reacciones de síntesis se convierte en ATP y AMP por la adenilato quinasa. El AMP activa la AMPK, que regula recíprocamente las rutas consumidoras y generadoras de ATP fosforilando enzimas clave (véase la Fig. 23-39). Condiciones o agentes que inhiben la producción de ATP por reacciones catabólicas (tales como la hipoxia, falta de glucosa, venenos metabólicos) aumentan la [AMP], activan la AMPK y estimulan el catabolismo. Las actividades celulares o del organismo que consumen ATP (contracción muscular, crecimiento) aumentan [AMP] y estimulan reacciones catabólicas para reponer el ATP. Cuando la [ATP] es elevada, el ATP impide la unión del AMP a la AMPK, disminuyendo así la actividad AMPK y enlenteciendo el catabolismo.

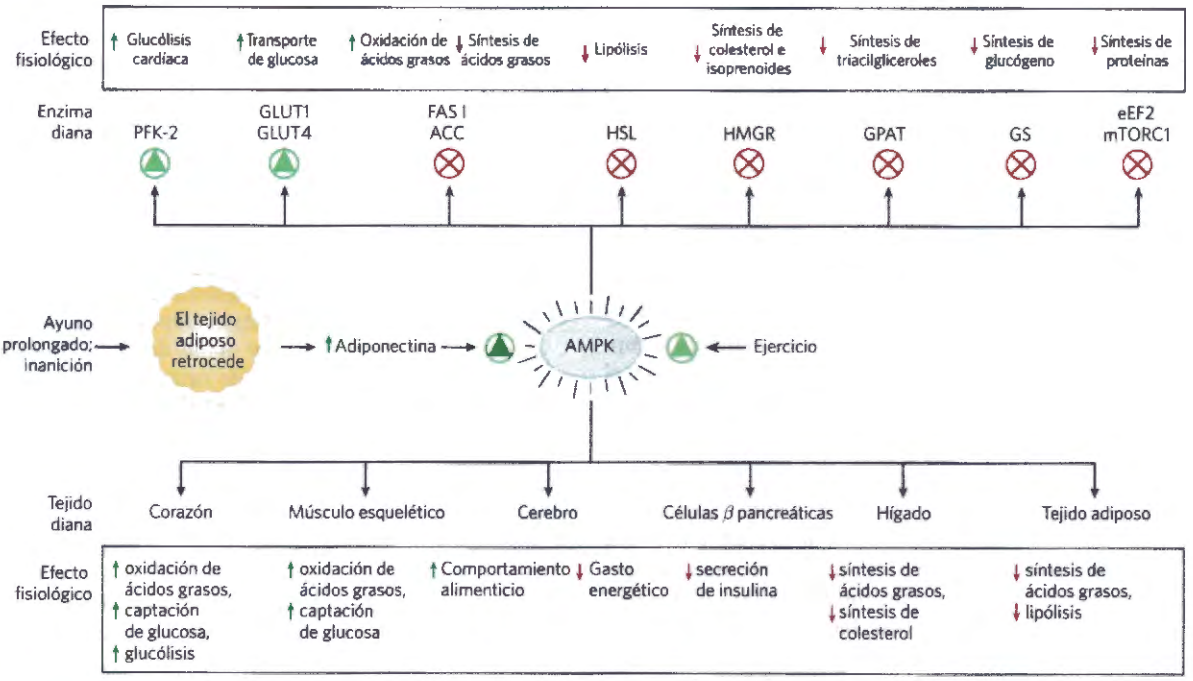


FIGURA 23-39 Formación de adiponectina y sus efectos a través de la AMPK. El ayuno prolongado o la inanición disminuyen las reservas de triacilgliceroles en el tejido adiposo, lo que estimula la síntesis y liberación de adiponectina por los adipocitos. El aumento de la adiponectina plasmática actúa a través de sus receptores de la membrana plasmática sobre varios tipos celulares y órganos inhibiendo los procesos que consumen energía y estimulando los que la producen. La adiponectina actúa a través de sus receptores en el cerebro estimulando la ingesta e inhibiendo la actividad física que consume energía, así como inhibiendo la termogénesis en la grasa marrón. La adiponectina ejerce sus efectos metabólicos activando la AMPK, que regula (por fosforilación) enzimas específicos de procesos metabólicos clave (véase la Fig. 15-8). PFK-2, fosfofructoquinasa-2; GLUT1 y GLUT4, transportadores de glucosa; FAS I, ácido graso sintasa I; ACC, acetil-CoA carboxilasa; HSL, lipasa sensible a hormonas; HMGR, HMG-CoA reductasa; GPAT, una acil transferasa; GS, glucógeno sintasa; eEF2, factor de elongación eucariótico 2 (necesario en la síntesis proteica; véase el Capítulo 27); mTORC1, diana en mamíferos de la rapamicina (una proteína quinasa que regula la síntesis proteica según la disponibilidad de nutrientes; véase la Fig. 23-41). Los fármacos de tiazolidinodiona activan el factor de transcripción PPARγ (véanse las Figs. 23-42, 23-43) que, a su vez, activan la síntesis de adiponectina activando indirectamente la AMPK. El ejercicio, a través de la conversión de ATP en ADP y AMP, también estimula la AMPK.

gía. La leptina, tal como hemos visto, lleva al cerebro la señal "el tejido adiposo está lleno" con lo que los procesos catabólicos se hacen más lentos y se favorecen el crecimiento y la biosíntesis.

La AMPK es un complejo heterotrimérico en todos los eucariotas **(Fig. 23-40)**. En los mamíferos, las diferentes isoformas de cada subunidad están codificadas por genes diferentes. Hay, al menos, 12 combinaciones de las tres subunidades, algunas de las cuales se sabe que solo se expresan en un tejido. El módulo catalítico tiene el dominio típico de las proteína quinasa. El módulo regulador tiene cuatro sitios potenciales de unión de AMP, a cierta distancia del sitio catalítico. Una hendidura profunda de fijación del sustrato incluye la Thr^{172}, que, cuando está fosforilada, según se ha explicado anteriormente, activa el enzima en un factor de 100.

En la superficie citoplasmática de los lisosomas, la AMPK interacciona con un segundo regulador principal de la actividad celular, la proteína quinasa mTORC1. Este complejo enzimático evalúa si hay suficientes nutrientes y sustratos de baja masa molecular para sostener el crecimiento celular y la proliferación. Conjuntamente, las dos proteína quinasas controlan aspectos principales de la actividad y destino de una célula.

La ruta mTORC1 coordina el crecimiento celular con el suministro de nutrientes y energía

La Ser/Thr quinasa, de cinco subunidades, **mTORC1**, que está muy conservada, se activa por la acción de señales intra- y extracelulares que indican suministros de energía y nutrientes abundantes; aminoácidos de cadena lateral ramificada, insulina y una elevada razón [ATP]/[AMP]. Cuando los nutrientes son suficientes, uno o más de los componentes de la mTORC1 mantienen todo el complejo en la superficie exterior de los lisosomas. Una vez activada, la mTORC1 fosforila varios factores de transcripción lo que conduce a un aumento de la biogénesis ribosómica y a un aumento de la expresión de los genes que codifican los enzimas de la síntesis de lípidos, a la proliferación mitocondrial y a un aumento de la biogénesis de ribosomas **(Fig. 23-41)**. El ayuno da lugar a la inactivación de la mTORC1 con la consecuencia de un aumento en la degradación de proteínas y glucógeno en el hígado y músculo y a una movilización de TAG en el tejido adiposo. La activación crónica de la mTORC1 por un exceso de ingesta produce un exceso de deposición de TAG en el tejido adiposo y también en el hígado y músculo, que puede contribuir a la insensibilidad a la insulina y a diabetes tipo 2 (véase la Sección 23.5). Las mutaciones que dan lugar a una mTORC1

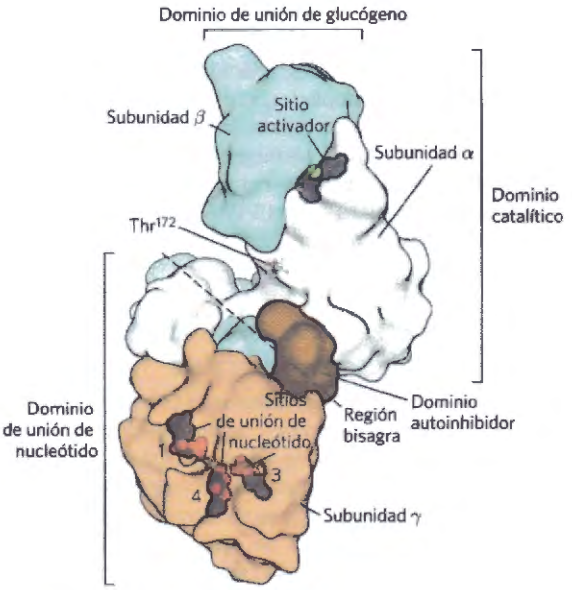


FIGURA 23-40 Estructura de la AMPK. El enzima es un heterotrímero con dos mitades distintas: un módulo catalítico y un módulo de unión de nucleótido con cuatro sitios de unión de nucleótido. La región bisagra que conecta estos dos módulos contiene un dominio autoinhibidor, que, en ausencia de AMP unido, ocupa el sitio de unión de sustrato inactivando el enzima. Cuando hay AMP unido, un cambio alostérico estira el segmento autoinhibidor fuera del sitio de unión de sustrato, dando paso a la unión de proteínas diana específicas y activando el enzima. Cuando hay ATP unido al módulo de unión de nucleótido los dos fosfatos extra del ATP impiden de algún modo la activación alostérica. La Thr^{172}, que, cuando está fosforilada activa el enzima en un factor de 100, se encuentra en la región entre los módulos catalítico y de unión de nucleótido. Un dominio de unión de glucógeno en el módulo catalítico probablemente interviene en la unión de la AMPK a partículas de glucógeno, en donde el enzima actúa para equilibrar la síntesis y degradación del glucógeno. [Fuente: PDB ID 4CFE, B. Xiao et al., *Nature Coomun.* 4:3017, 2013.]

constantemente activada también están frecuentemente asociadas con cánceres humanos.

La dieta regula la expresión de genes cruciales para el mantenimiento de la masa corporal

Proteínas de una familia de factores de transcripción activados por ligandoconocidos como **receptores peroxisómicos activados por proliferador (PPAR)**, responden a cambios en los lípidos de la dieta alterando la expresión de genes que intervienen en el metabolismo de grasas y glúcidos. Estos factores de transcripción se identificaron por primera vez por su función en la síntesis de peroxisomas, de ahí su nombre. Sus ligandos normales son ácidos grasos o derivados de ácidos grasos, pero también pueden unir agonistas sintéticos y pueden ser activados por manipulación genética en el laboratorio. Los PPARα, PPARδ y PPARγ son miembros de esta superfamilia de receptores nucleares. Actúan en el núcleo formando heterodímeros con otro receptor nuclear, el RXR, uniéndose seguidamente a regiones reguladoras de DNA cerca de los genes bajo su control y cambiando su velocidad de transcripción **(Fig. 23-42)**.

PPARγ, se expresa en diversos tejidos, incluido el tejido adiposo (marrón, beige y blanco), es necesario en la activación de genes requeridos en la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y de genes que codifican proteínas utilizadas en la síntesis y almacenamiento de lípidos en los adipocitos **(Fig. 23-43)**. El PPARγ se activa por fármacos de la clase de las tiazolidinadionas utilizadas en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (se discuten más adelante).

El **PPARα** se expresa en el hígado, riñón, corazón, músculo esquelético y en el tejido adiposo marrón. Entre los ligandos que activan este factor de transcripción se encuentran los icosanoides, los ácidos grasos libres y los fármacos denominados fibratos, tales como el fenofibrato (TriCor) y el ciprofibrato, que se usan para tratar las enfermedades coronarias, pues fomentan el aumento de las HDL y la disminución de los TAG de la sangre. En los hepatocitos, el PPARα activa los genes necesarios para la β-oxidación de ácidos grasos y para la formación de cuerpos cetónicos durante el ayuno.

El **PPARδ** y el **PPARβ** son reguladores clave de la oxidación de grasas que actúan en respuesta a los cambios en los lípidos de la dieta. PPARδ actúa en el hígado

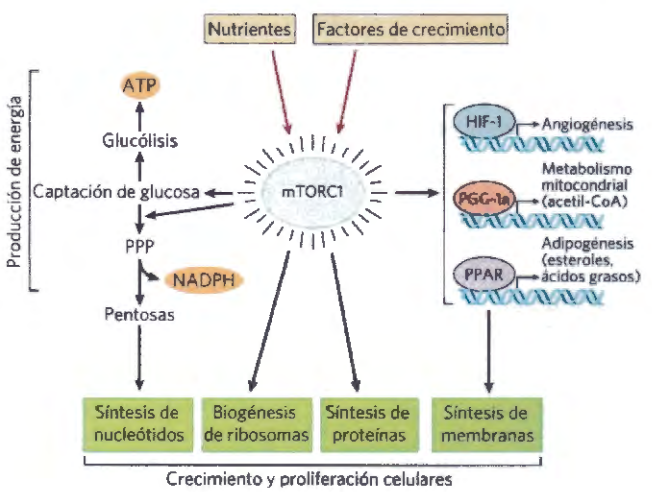


FIGURA 23-41 mTORC1 estimula el crecimiento y la proliferación celulares cuando hay una nutrición adecuada. mTORC1 es una Ser/Thr proteína quinasa activada por factores de crecimiento y metabolitos que indican un estado nutricional adecuado Mediante fosforilación de proteínas diana claves, mTORC1 activa la producción de energía (ATP y NADPH) para la biosíntesis y estimula la síntesis de proteínas y lípidos lo que permite el crecimiento y la proliferación celulares. PPP ruta de las pentosas fosfato; HIF-1, factor de transcripción inducible de la hipoxia; PGC-1α, coactivador-1α de PPARγ; PPAR, receptor de peroxisomas activado por proliferador; FA, ácidos grasos. [Fuente: Información de J. L. Yecies y B. D. Manning, *J. Mol. Biol.* 89:221, 2011, Fig. 2.]

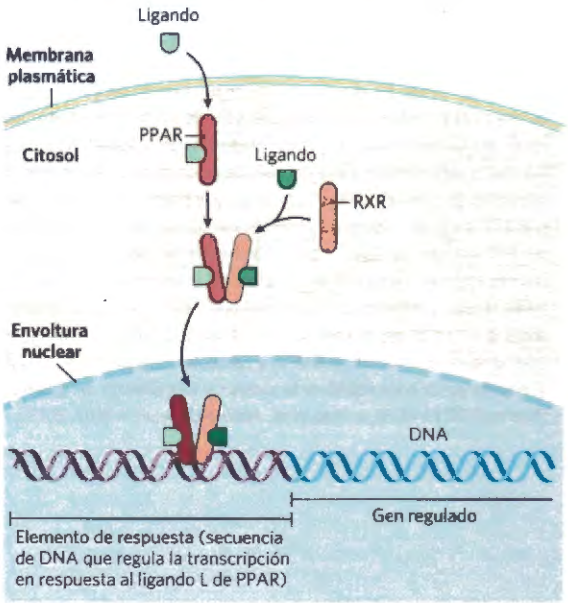


FIGURA 23-42 Modo de acción de los PPAR. Los PPAR son factores de transcripción que al unirse a su ligando específico (L) forman heterodímeros con el receptor nuclear RXR. El dímero se une a regiones específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta, y de este modo estimula la transcripción de los genes de estas regiones. [Fuente: Información de R. M. Evans et al., *Nature Med.* 10:355, 2004, Fig. 3.]

y en el músculo estimulando la transcripción de al menos nueve genes que codifican proteínas de la β-oxidación y para la disipación de energía a través del desacoplamiento de las mitocondrias. Ratones normales sobrealimentados con dietas ricas en grasas acumulan grandes cantidades de grasa blanca y se acumulan gotículas de grasa en el hígado. Cuando el mismo experimento de sobrealimentación se realiza con ratones que tienen PPARδ alterado genéticamente, de modo que siempre es activo, no se produce la acumulación de grasa. En ratones con receptores de leptina no funcionales (*db/db*), el PPARδ activado impide el desarrollo de la obesidad que en caso contrario se hubiese producido. Al estimular la degradación de ácidos grasos en mitocondrias desacopladas, el PPARδ provoca la disminución de las grasas, pérdida de peso y termogénesis. A la luz de todo esto, la termogénesis es tanto un medio para mantenerse caliente como una defensa contra la obesidad. Está claro que el PPARδ es una diana potencial de los medicamentos para el tratamiento de la obesidad.

La grelina, la PYY_{3-36} y los cannabinoides influyen en los hábitos de ingesta a corto plazo

La hormona peptídica **grelina** está producida por células que revisten el estómago. Se identificó originalmente como el estímulo para la liberación de la hormona de crecimiento (*ghre* es una raíz proto-indo-europea que significa "crecimiento"), y se vio posteriormente que era un estimulante poderoso del apetito que actúa en una escala de tiempo más corta (entre comidas) que la leptina y la insulina. Los receptores de grelina están situados en la hipófisis, presumiblemente interviene en la liberación de la hormona del crecimiento, y en el hipotálamo, donde afecta al apetito, así como en el músculo cardiaco y en el tejido adiposo. La grelina actúa a través de un GPCR y genera el segundo mensajero IP_3, que interviene en la acción de la hormona. La concentración de grelina en sangre fluctúa de forma manifiesta durante el día, con un máximo justo antes de una comida y un descenso abrupto justo después de la comida (Fig. 23-44). La inyección de grelina a produce sensaciones inmediatas de hambre intensa en humanos. Los individuos con el síndrome de Prader-Willi, cuyos niveles sanguíneos de grelina son excepcionalmente elevados, tienen un apetito incontrolable que provoca una obesidad extrema que, frecuentemente, lleva a la muerte antes de los 30 años de edad.

La **PYY_{3-36}** es una hormona peptídica (34 residuos aminoácidos) secretada por células endocrinas del revestimiento del intestino delgado y del colon en res-

Copy Station

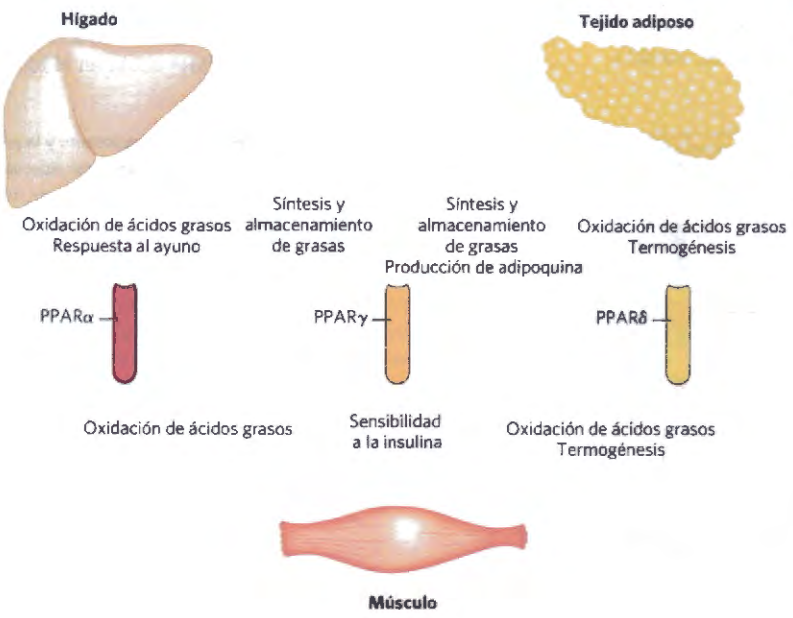


FIGURA 23-43 Integración metabólica por los PPAR. Las tres isoformas de los PPAR regulan la homeostasis de los lípidos y la glucosa mediante efectos coordinados sobre la expresión génica en el hígado, músculo y tejido adiposo. PPARα y PPARδ (y su isoforma muy parecida PPARβ) regulan la utilización de los lípidos; PPARγ regula el almacenamiento de lípidos y la sensibilidad a la insulina en varios tejidos.

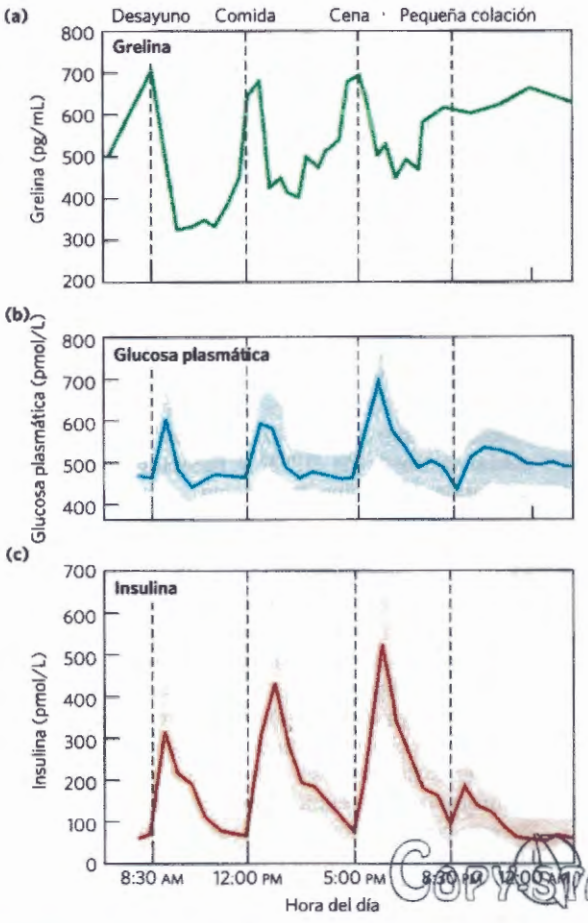


FIGURA 23-44 Variaciones sanguíneas de la glucosa, grelina e insulina en relación con los horarios de comida. **(a)** Los niveles plasmáticos de grelina aumentan abruptamente justo *antes* de la hora normal de las comidas (7 de la mañana para el desayuno, 12 para la comida de mediodía, 17.30 para la cena) y caen rápidamente inmediatamente después de las comidas, en paralelo con la sensación subjetiva de hambre. **(b)** La glucosa en plasma aumenta abruptamente *después* de una comida, (c) seguido inmediatamente de un aumento de insulina como respuesta al incremento en la concentración de glucosa en sangre. [Fuentes: (a, c) Datos de D. E. Cummings et al., *Diabetes* 50:1714, 2001, Fig. 1. (b) Datos de M. D. Feher y C. J. Bailey, *Br. J. Diabet. Vasc. Dis.* 4:39, 2004.]

puesta a la entrada de alimento desde el estómago. El nivel de PYY_{3-36} en sangre aumenta después de una comida y permanece elevado durante unas horas. La hormona se transporta por la sangre hasta el núcleo arcuato donde actúa sobre las neuronas orexigénicas, inhibiendo la liberación de NPY y reduciendo el hambre (Fig. 23-36). Los humanos a los que se inyecta PYY_{3-36} tienen poco apetito y comen cantidades inferiores a las normales durante unas 12 horas.

La **O-GlcNAc transferasa (OGT)** es un enzima que actúa amortiguando el apetito. Este enzima transfiere el aminoazúcar *N*-acetil glucosamina desde el nucleótido azúcar UDP-GlcNAc al grupo hidroxilo de cadenas laterales de Ser y Thr. Entre sus dianas se encuentran proteínas sinápticas de neuronas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Cuando se inhibe la OGT en ratones de experimentación, estos comen casi el doble que los animales control y triplican su tejido adiposo en dos semanas. La actividad OGT en ratones control aumenta cuando hay alimento disponible, lo que conduce a un modelo para la saciedad en el que el acceso al alimento activa la OGT en neuronas críticas del núcleo paraventricular. Después de un lapso (el período de la comida), la modificación postraducción de las proteínas sinápticas por la OGT desencadena potenciales de acción que transportan el mensaje: ¡Para de comer! Sin este mensaje, el animal come el doble y se vuelve obeso.

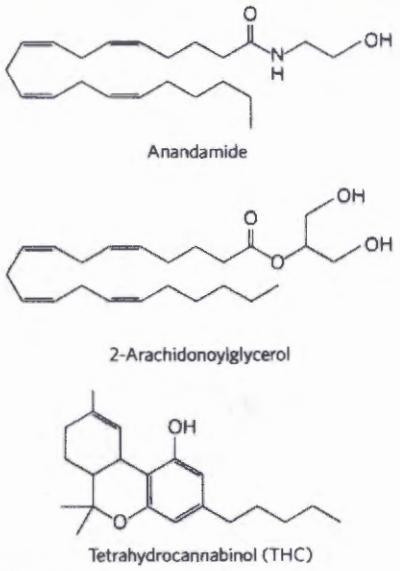


FIGURA 23-45 Cannabinoides. Dos endocannabinoides producidos por animales y el producto psicotrópico vegetal tetrahidrocannabinol (THC) presente en la marihuana.

Los **endocannabinoides (Fig. 23-45)** son mensajeros lipídicos que actúan a través de receptores específicos en el cerebro y por todo el sistema nervioso incrementando el apetito, elevando la respuesta sensorial al alimento (especialmente alimentos dulces y grasos) y elevando el estado de ánimo. Cuando la comida entra en la boca, las señales neuronales viajan hasta el cerebro, y desde allí por el nervio vago hasta el intestino que, entonces, produe y libera endocannabinoides. Los receptores de los endocannabinoides son GPCR que controlan canales iónicos de neuronas sensoriales, cambiando sus potenciales de membrana y enviando señales al cerebro. Alimentos gustosos detectados de esta manera incentivan el consumo adicional de estos alimentos. El gusto de las grasas (que tienen un contenido calórico especialmente elevado) promueven la liberación de cannabinoides, que de modo efectivo provocan el consumo adicional. Bien conservado a través de las especies de vertebrados, este sistema evolucionó probablemente para maximizar la ingestión de comida y para proteger contra la inanición. En los mamíferos, la acción de los cannabinoides estimula un incremento en la masa de grasa e inhibe la pérdida de energía por la actividad motora o la termogénesis. Los receptores de los cannabinoides también intervienen en los efectos psicoactivos del tetrahidrocannabinol (Fig. 23-45), uno de los ingredientes activos de la marihuana, conocido desde hace tiempo por su efecto estimulante sobre el apetito.

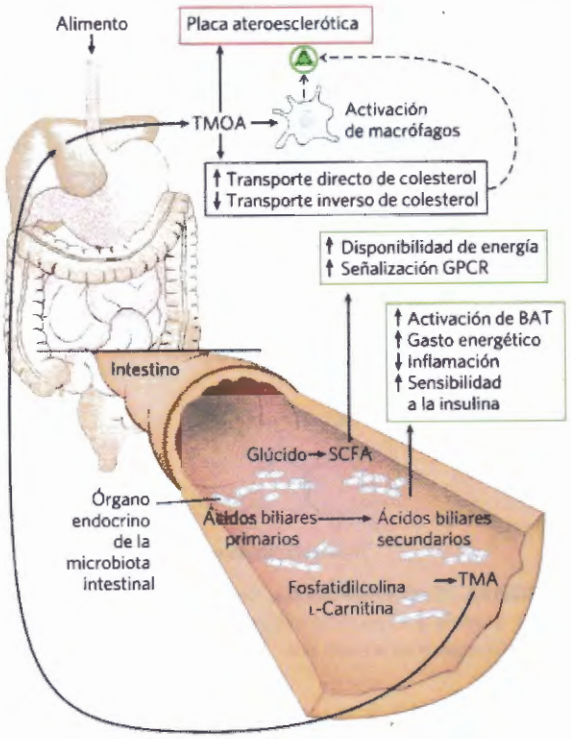


FIGURA 23-46 Efectos del metabolismo de los microbios intestinales sobre la salud. El enorme número y diversidad de los microorganismos (microbiota) en el colon genera productos metabólicos que pueden tener efectos significativos, tanto positivos como negativos, sobre la salud. Por ejemplo, el metabolismo de los ácidos biliares primarios por la microbiota da lugar a productos secundarios que actúan a través de receptores nucleares estimulando la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT) del huésped e incrementando tanto el consumo energético como la sensibilidad a la insulina al tiempo que reducen la inflamación. El metabolismo por la microbiota de glúcidos no digeridos produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que señalan la expansión del tejido adiposo blanco (WAT) del huésped, lo que promueve la obesidad. Los SCFA producidos por la microbiota también son una fuente de energía fácilmente metabolizable por el huésped. La producción microbiana del SCFA propionato impide la lipogénesis en el hígado y disminuye el colesterol en sangre, las dos cosas favorables para la salud. Por otro lado, la conversión metabólica de la fosfatidilcolina y la L-carnitina a trimetilamina (TMA) y su posterior conversión en el hígado a trimetilamina-*N*-óxido (TMAO) da lugar a cambios a través de receptor en el transporte de colesterol y actividad de los macrófagos. La combinación de un transporte de colesterol alterado y un aumento de la actividad de los macrófagos puede llevar a la formación de placas ateroscleróticas (véase la Fig. 21-46). El conocimiento de cómo los individuos pueden conseguir y mantener un equilibrio saludable de la microbiota constituye un reto mayúsculo para el futuro.

Simbiontes microbianos del intestino influyen sobre el metabolismo energético y la adipogénesis

Una persona adulta alberga alrededor de 10^{14} células microbianas que habitan en el intestino. Estos microbios funcionan como un órgano endocrino importante, produciendo una diversidad de metabolitos con efectos profundos sobre el metabolismo, comportamiento alimentario y masa corporal del huésped. Los individuos delgados y los obesos contienen combinaciones diferentes de simbiontes microbianos en el intestino. Investigaciones sobre esta observación condujeron al descubrimiento de que los microbios del intestino liberan productos de fermentación: ácidos grasos de cadena corta tales como acetato, propionato, butirato y lactato, que entran en el torrente circulatorio y desencadenan cambios metabólicos en el tejido adiposo **(Fig. 23-46)**. El propionato, por ejemplo, impulsa la expansión del WAT al actuar sobre GPCR (GPR41 y GPR43) en las membranas plasmáticas de diversos tipos celulares, incluidos los adipocitos. Estos receptores desencadenan la diferenciación de células precursoras (preadipocitos) a adipocitos e inhiben la lipólisis en los adipocitos ya existentes lo que lleva a un incremento de la masa del WAT, es decir, obesidad. Los microbios intestinales también convierten ácidos biliares primarios, sintetizados en el hígado, en los ácidos biliares secundarios desoxicolato y litocolato, que entran en el torrente circulatorio y actúan a través de GPCR y receptores de esteroides activando los adipocitos beige para que produzcan UCP1 e incrementen el gasto energético.

Estos descubrimientos sugieren la posibilidad de prevenir la obesidad mediante la alteración de la constitución de la comunidad microbiana en el intestino. Esto podría llevarse a cabo añadiendo, directamente al intestino, especies microbianas (**probióticos**) que se opondrían a la adipogénesis, o bien añadiendo a la dieta nutrientes (**prebióticos**) que favorecerían el dominio de los microbios probióticos. Por ejemplo, los fructanos, polímeros de fructosa indigeribles para los animales, favorecen una comunidad microbiana específica. Cuando esta combinación de microorganismos está presente, desciende el almacenamiento de grasa en WAT e hígado y no hay ninguna disminución de la sensibilidad a la insulina asociada con la obesidad y el depósito de lípidos en el hígado (véase más adelante). Investigadores han trasplantado incluso material fecal de un ratón delgado a uno obeso y han encontrado que en el intestino del animal receptor se establece una nueva colección de microbios. Además, el animal pierde peso.

Copy-Station

Las células endocrinas presentes en el revestimiento del tracto intestinal secretan productos, los péptidos anorexigénicos PYY_{3-36} y GLP-1, así como el orexigénico grelina, que modulan la ingesta de alimento y el consumo energético. La interacción con microbios específicos del intestino, o con sus productos de fermentación, pueden ser desencadenantes de la liberación de estos péptidos. Un conocimiento de cómo interaccionan la dieta y los simbiontes microbianos para afectar el metabolismo energético y la adipogénesis es una clave importante para entender el desarrollo de la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

Este sistema de controles neuroendocrinos sobre la ingesta de alimento y el metabolismo, interconectado de manera exquisita, probablemente haya evolucionado para proteger contra la inanición y eliminar la acumulación contraproducente de grasa (obesidad extrema). La dificultad experimentada por muchas personas cuando intentan perder peso es testimonio de la notable efectividad de estos controles.

RESUMEN 23.4 Obesidad y regulación de la masa corporal

■ La obesidad es cada vez más frecuente en los Estados Unidos y otros países desarrollados y predispone a las personas a estados crónicos peligrosos para la vida

tales como la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo 2.

- El tejido adiposo produce la leptina, una hormona que regula la alimentación y el gasto energético para mantener reservas de grasa adecuadas. La producción y la liberación de leptina aumenta con el número y el tamaño de los adipocitos.
- La leptina actúa sobre receptores del núcleo arcuato del hipotálamo y provoca la liberación de péptidos anorexígenos (que suprimen el apetito), entre ellos la α-MSH que actúa sobre el cerebro para inhibir la sensación de hambre. La leptina también estimula la acción del sistema nervioso simpático sobre los adipocitos, que tiene como consecuencia el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial con la consiguiente termogénesis.
- El mecanismo de transducción de señal de la leptina implica la fosforilación del sistema JAK-STAT. La fosforilación por JAK posibilita que los STAT se unan a regiones reguladoras del DNA nuclear, alterando la expresión de genes que codifican proteínas que establecen el nivel de actividad metabólica y determinan el comportamiento alimenticio. La insulina actúa sobre receptores del núcleo arcuato con resultados similares a los de la leptina.
- La hormona adiponectina estimula la captación y oxidación de ácidos grasos e inhibe su síntesis. También sensibiliza el músculo y el hígado a la acción de la insulina. Para sus acciones ls adiponectina necesita la mediación de AMPK, que también es activada por [AMP] baja y el ejercicio.
- La grelina, una hormona producida en el estómago, actúa sobre las neuronas orexigénicas (estimulantes del apetito) del núcleo arcuato para producir hambre antes de una comida. La PYY_{3-36}, una hormona peptídica del intestino, actúa en el mismo sitio reduciendo el apetito después de una comida. Los endocannabinoides señalan la disponibilidad de alimento dulce o graso y estimulan su consumo.
- Los simbiontes microbianos del intestino dan lugar a productos de fermentación y ácidos biliares secundarios. Influyen sobre la liberación de hormonas intestinales que regulan la masa corporal.

23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes de tipo 2

En el mundo industrializado, donde la disponibilidad de alimentos es más que adecuada, existe una epidemia creciente de obesidad y de diabetes tipo 2 a ella asociada. En el mundo hay 300 millones de personas con diabetes y las proyecciones razonables predicen un aumento espectacular de casos durante la próxima década como consecuencia de la epidemia mundial de obesidad. La patología de la diabetes incluye enfermedades cardiovasculares, fallo renal, ceguera, amputaciones debidas neuropatía y mala curación en las extremidades que lleva a amputaciones. En el 2014, la mortalidad global debida a la diabetes se calculó en 4 millones, cifra que con toda seguridad aumentará en los próximos años. Es evidente que es necesario comprender la diabetes tipo 2 y su relación con la obesidad y encontrar contramedidas que prevengan o reviertan el daño causado por esta enfermedad. ■

En la diabetes tipo 2 los tejidos se vuelven insensibles a la insulina

El rasgo más genuino de la **diabetes tipo 2** es el desarrollo de resistencia a la insulina: estado en el que se necesita más insulina para conseguir los mismos efectos biológicos producidos por una menor cantidad de insulina en el estado de salud normal. En las primeras etapas de la enfermedad, las células β pancreáticas secretan suficiente insulina para compensar la menor sensibilidad del músculo y el hígado a la insulina. Pero las células β finalmente sucumben y la falta de insulina se manifiesta por la incapacidad del organismo para regular la glucosa en sangre. El estadio intermedio, previo a la diabetes mellitus tipo 2, se denomina a veces **síndrome metabólico** o **síndrome X**. Éste se caracteriza por obesidad, especialmente en el abdomen; hipertensión (alta presión sanguínea); lípidos sanguíneos anormales (TAG y LDL altos, HDL baja); glucosa en sangre ligeramente elevada en el ayuno y una capacidad disminuida para eliminar la glucosa en un test de tolerancia a la glucosa. Los individuos con síndrome metabólico a menudo también muestran cambios en las proteínas sanguíneas, cambios que están asociados con la coagulación anormal (elevada concentración de fibrinógeno) o la inflamación (elevada concentración de péptido C reactivo, que aumenta de modo característico en la respuesta inflamatoria). ¡Alrededor del 27% de la población adulta de Estados Unidos presenta estos síntomas del síndrome metabólico!

¿Qué es lo que predispone a los individuos con síndrome metabólico a desarrollar diabetes tipo 2? De acuerdo con la hipótesis de la "toxicidad lipídica" **(Fig. 23-47)**, la acción de la PPARγ sobre los adipocitos los mantiene normalmente en disposición de sintetizar y almacenar triacilgliceroles (los adipocitos son sensibles a la insulina y producen leptina, que provoca el almacenamiento intracelular continuado de TAG). Sin embargo, en los individuos obesos el exceso de ingestión de calorías hace que los adipocitos estén rellenos de TAG y que el tejido adiposo no pueda afrontar aumentos ulteriores de la demanda de almacenamiento de TAG. El tejido adiposo relleno de lípidos libera factores proteicos que atraen a los macrófagos, los cuales infiltran el tejido y pueden llegar a representar el 50% en peso del tejido adiposo. Los macrófagos desencadenan la respuesta inflamatoria que interfiere en el depósito de TAG en los adipocitos y favorece la salida de ácidos grasos libres a la sangre. Este exceso de ácidos grasos penetra en las células hepáticas y musculares, en donde se convierten en TAG que se acumulan en forma de gotículas de lípido. Este depósito ectópico (del griego *ektopos*, "fuera de lugar") de TAG provoca la insensibilidad a la insulina en el hígado y en el músculo, característica distintiva de la diabetes tipo 2.

Según esta hipótesis, el exceso de ácidos grasos y TAG almacenados son tóxicos para el hígado y el músculo. Algunos individuos están menos dotados genéticamente para afrontar semejante carga de lípidos ectópicos y son más susceptibles al daño celular que conduce al desarrollo de la diabetes tipo 2. La resistencia a la insulina implica probablemente el deterioro de varios de los mecanismos a través de los cuales la insulina ejerce sus efectos metabólicos: cambios en los niveles de pro-

Copystation

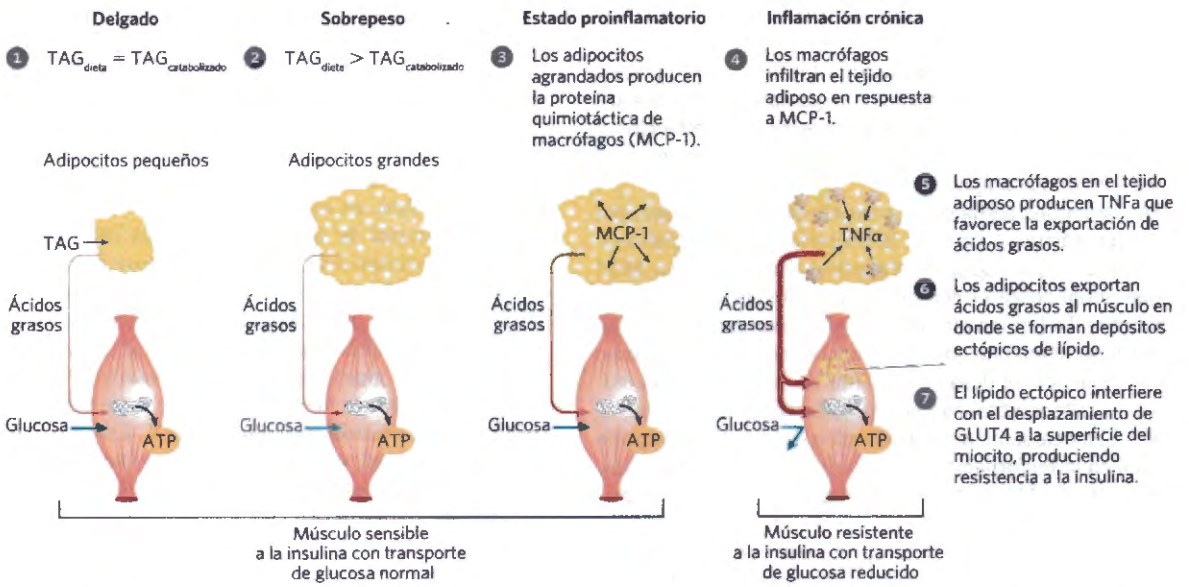


FIGURA 23-47 La sobrecarga de los adipocitos con triacilgliceroles desencadena la inflamación en el tejido graso y la deposición ectópica de lípidos y resistencia a la insulina en el músculo. En un individuo con una masa corporal sana, la captación de TAG de la dieta se equilibra con la oxidación de TAG para obtener energía. En los individuos con sobrepeso, el exceso en la ingestión de calorías da lugar a adipocitos más grandes abarrotados con TAG e incapaces de almacenar más. Los adipocitos agrandados secretan MCP-1 (proteína-1 de la quimiotaxis de monocitos), que atrae macrófagos. Los macrófagos se infiltran en el tejido adiposo y producen TNF α (factor α de la necrosis tumoral) que provoca la degradación de lípidos y la liberación de ácidos grasos a la sangre. Los ácidos entran en los miocitos, donde se acumulan en donde se acumulan en forma de pequeñas gotículas de lípido. Este almacenamiento ectópico de lípidos en el músculo produce, de alguna manera, una resistencia a la insulina, quizás al producir proteína quinasas activadas por lípidos que inactivan algún elemento de la ruta de señalización de la insulina. Los transportadores de glucosa GLUT4 abandonan la superficie del miocito con lo que impiden la entrada de glucosa en el músculo; los miocitos son ahora, resistentes a la insulina. No pueden utilizar glucosa sanguínea como combustible por lo que movilizan ácidos grasos del tejido adiposo que constituyen ahora el combustible principal. El incremento en la entrada de ácidos grasos hacia el interior del músculo conduce a una deposición adicional de lípidos ectópicos. En algunos individuos la resistencia a la insulina se transforma en diabetes tipo 2. Otros individuos son diferentemente menos susceptibles a los efectos perjudiciales del almacenamiento ectópico de lípidos o están genéticamente mejor dotados para gestionar este almacenamiento sin desarrollar diabetes. [Fuente: Información de A. Guilherme et al., *Mol. Cell Biol.* 9:367, 2008, Fig. 1.]

COPY STATION

teínas, cambios en las actividades de enzimas de señalización y de factores de transcripción. Por ejemplo, tanto la síntesis de adiponectina en los adipocitos como la adiponectina en sangre disminuyen con la obesidad y aumentan con la pérdida de peso.

Varios fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina en la diabetes tipo 2 actúan sobre proteínas específicas de las rutas de señalización y su acción está de acuerdo con el modelo de la lipotoxicidad. Las **tiazolidinodionas** (utilizadas para tratar la diabetes tipo 2; véase la Fig. 21-22) se unen al PPARγ, activando una serie de genes específicos de los adipocitos que promueven la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos pequeños y de este modo aumentan la capacidad del organismo para absorber ácidos grasos de la dieta y almacenarlos como TAG.

Hay factores genéticos que claramente predisponen a la diabetes tipo 2. Aunque el 80% de diabéticos tipo 2 son obesos, la mayoría de individuos obesos no desarrollan diabetes tipo 2. Dada la complejidad de los mecanismos de regulación descritos en este capítulo no es sorprendente que la genética de la diabetes sea compleja y que incluya interacciones entre genes variables y factores ambientales, entre los que se cuentan la dieta y el estilo de vida. Al menos 10 loci genéticos han sido asociados con seguridad con la diabetes tipo 2; los cambios en uno solo de cualquiera de estos "diabetogenes" producirían un aumento relativamente pequeño de la probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2. Por ejemplo, los individuos con una variante del PPARγ en la que un residuo Ala sustituye a la Pro en posición 12 muestran un pequeño pero significativo aumento del riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2. ■

La diabetes tipo 2 se trata con dieta, ejercicio, y medicación y cirugía

Diversos estudios muestran que hay tres factores que mejoran la salud de los individuos con diabetes tipo 2: dieta restringida, ejercicio regular y fármacos que aumenten la sensibilidad a la insulina o su producción. La dieta restringida (y la consiguiente pérdida de peso) reduce la carga general del manejo de los ácidos grasos. La composición lipídica de la dieta influye, a través de los PPAR y otros factores de transcripción, en la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos y en la combustión de la grasa. El ejercicio activa la AMPK, al igual que la adiponectina; el AMPK desplaza el metabolismo hacia la oxidación de las grasas e inhibe la síntesis de las mismas.

El ejercicio consume calorías ny de esta forma contribuye directamente a la pérdida de peso. El ejercicio también aumenta la liberación de **irisina** del músculo a la sangre. La irisina aumenta la expresión de los genes *UCP1* en el WAT y también estimula el desarrollo de

TABLA 23-8 Tratamientos de la diabetes mellitus tipo 2

Intervención/tratamiento	Diana directa	Efecto del tratamiento
Pérdida de peso	Tejido adiposo; reduce el contenido de TAG	Reduce la carga lipídica; aumenta la capacidad de almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo; restablece la sensibilidad a la insulina
Ejercicio	Activación de la AMPK por aumento de [AMP]/[ATP]	Ayuda a la pérdida de peso; véase la Fig. 23-39
Cirugía bariátrica	Desconocida	Conduce a pérdida de peso, mejor control de la glucosa sanguínea
Sulfonilureas: glipizide (Glucotrol), gliburide (Micronase), glimepirida (Amaryl)	Células β pancreáticas; bloqueo de los canales de K^+	Estimula la secreción de insulina por el páncreas; véase la Fig. 23-28
Biguanidas: metformina (Glucophage)	Activación de la AMPK	Aumenta la captación de glucosa por el músculo; disminuye la producción de glucosa en el hígado
Tiazoladinodionas: troglitazona (Rezulin),[a] rosiglitazona (Avandia),[b] pioglitazona (Actos)	PPARγ	Estimula la expresión de algunos genes, potenciando la acción de la insulina en el hígado, músculo y tejido adiposo; aumenta la captación de glucosa; disminuye la síntesis de glucosa en el hígado
Moduladores del GLP-1: exenatide (Byetta), sitagliptina (Januvia)	Péptido-1 tipo glucagón, dipéptido proteasa IV	Aumenta la secreción de insulina por el páncreas

[a]Retirado de manera voluntaria debido a los efectos secundarios.

[b]Recetas limitadas a pacientes que no responden a otros tratamientos, debido a un aumento posible de riesgo de enfermedad cardiovascular.

adipocitos beige, por lo que aún después de finalizar el ejercicio, continúa usándose energía en la termogénesis.

En el tratamiento de la diabetes tipo 2 se utilizan varias clases de fármacos, algunos de los cuales ya hemos discutido en este capítulo (Tabla 23-8). Las sulfonilureas actúan sobre los canales de K^+ controlados por ATP de las células β para estimular la liberación de insulina. Las biguanidas tales como metformina (Glucophage) activan la AMPK. Su diana directa es el Complejo I mitocondrial; su inhibición por la metformina reduce la producción de ATP y aumenta la [AMP], la cual activa la AMPK. La AMPK desencadena el desplazamiento hacia el metabolismo conservador de energía: incremento en la captación y oxidación de glucosa, aumento de la movilización y oxidación de ácidos grasos e inhibición de la síntesis de ácidos grasos y esteroles. Ya hemos observado que las tiazolidinodionas actúan a través de PPARγ para aumentar la concentración de adiponectina en el plasma y estimular la diferenciación de los adipocitos, aumentando así la capacidad de almacenamiento de TAG.

En casos de obesidad extrema y diabetes tipo 2, puede aliviarse la diabetes, o incluso revertirse, mediante el tratamiento más efectivo de pérdida de peso para la obesidad severa o mórbida: la cirugía bariátrica, que altera el camino del alimento a través del estómago hacia la parte superior del intestino delgado (duodeno) **(Fig. 23-48)**. En la derivación (by-pass) gástrica Roux-en-Y (RYGBP, así llamada por el cirujano suizo César Roux que desarrolló este procedimiento), el estómago se reduce a una pequeña bolsa unida al esófago y la región media del intestino delgado (el yeyuno) se une directamente a dicha bolsa. El alimento evita la mayor parte del estómago y del duodeno y va, principalmente a la "rama de Roux" del intestino. El ácido del estómago y los enzimas digestivos discurren a través de porciones derivadas del intestino para unirse al alimento en el canal común. Las personas que se someten a cirugía RYGBP no solo experimentan una reducción de peso espectacular sino que también tienen menos apetito. Es de destacar que esta cirugía también revierte la diabetes tipo 2 en muchos casos. La explicación de estos efectos reside probablemente en la alteración de la comunicación entre el intestino, el cerebro y otros órganos. Podría ser el resultado de cambios en el tipo y cantidad de hormonas peptídicas (tales como GLP-1 y $PYY_{3\text{-}36}$), secretadas por el intestino que indican saciedad e inhiben el comportamiento alimentario. Aún no se ha escrito la última palabra sobre este tema. ■

COPYRIGHTED MATERIAL

RESUMEN 23.5 Obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2

- El síndrome metabólico, que incluye la obesidad, hipertensión, lípidos sanguíneos elevados y resistencia a la insulina, es a menudo el preludio de la diabetes tipo 2.
- La resistencia a la insulina que caracteriza la diabetes tipo 2 puede ser consecuencia del almacenamiento anormal de lípidos en el músculo y en el hígado en respuesta a una ingesta de lípidos que no puede ser acomodada por el tejido adiposo.
- La expresión de los enzimas de la síntesis de lípidos se encuentra sometida a una regulación estricta y compleja. Los PPAR son factores de transcripción que determinan la velocidad de síntesis de muchos enzimas que intervienen en el metabolismo lipídico y en la diferenciación de los adipocitos.

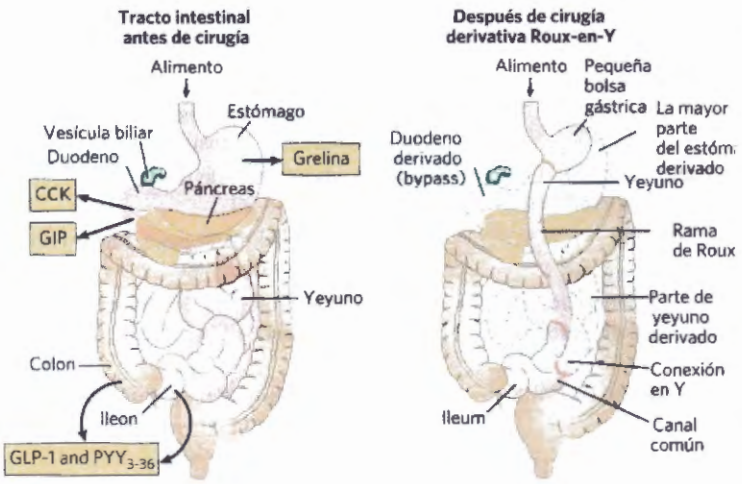


FIGURA 23-48 Cirugía bariátrica. El sistema digestivo produce hormonas peptídicas (grelina, colecistoquinina (CCK), GIP, PYY_{3-36} y GLP-1) que afectan la homeostasis energética, incluidas el hambre y la saciedad. Aquí se muestran el tracto gastrointestinal humano normal (arriba y a la izquierda) y el trato GI después de la derivación gástrica Roux-en-Y (cirugía bariátrica, derecha). En este procedimiento quirúrgico se derivan (bypass) la mayor parte del estómago y la porción superior del intestino delgado (duodeno). Esto da como resultado una rápida pérdida de peso (hasta unos 4,5 kg en una semana), así como una mejor regulación de la glucosa sanguínea en individuos con diabetes tipo 2. Un nuevo tratamiento, quirúrgico la gastroplastia vertical en banda (no mostrada) proporciona resultados similares. Las bases bioquímicas y fisiológicas de estos efectos no son bien conocidas, pero probablemente incluye cambios en la señalización por hormonas peptídicas resultado de redirigir el alimento a través del trato GI.

■ Entre los tratamientos eficaces de la diabetes tipo 2 se cuentan el ejercicio, la dieta apropiada y los fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina o la producción de insulina. La alteración quirúrgica del tracto digestivo lleva a una pérdida de peso y a menudo revierte la diabetes tipo 2.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

hormona 899
sistema
neuroendocrino 900
radioinmunoensayo (RIA) 900
ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA) 902
metabotrópico 902
ionotrópico 902
endocrino 903
paracrino 903
autocrino 903
hormonas
peptídicas 903
insulina 904
adrenalina 904
noradrenalina 904
catecolaminas 904
hormonas icosanoides 904
hormonas esteroideas 905
hormona de la vitamina D (calcitriol) 905
hormonas retinoides 906
hormonas del tiroides 906
óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) 906
NO sintasa 906
hipotálamo 907
hipófisis posterior 907
hipófisis anterior 907
hormonas trópicas (tropinas) 907
hepatocito 911
tejido adiposo blanco (WAT) 914
adipocito 914
tejido adiposo marrón (BAT) 915
proteína desacoplante 1 (UCP1) 915
termogénesis 915
tejido adiposo beige 916
miocito 916
eritrocito 921
leucocito 921
linfocitos 921
plaquetas 921
plasma sanguíneo 921
proteínas plasmáticas 921
canales de K^+ regulados por ATP 923
sulfonilureas 924
glucagón 925
cortisol 930
diabetes mellitus 930
diabetes tipo 1 930
diabetes tipo 2 930
glucosuria 930
cetosis 930
acidosis 931
cetoacidosis 931
prueba de tolerancia a la glucosa 931
índice de masa corporal (BMI) 931
adipoquinas 931
leptina 932
orexigénico 933
neuropéptido Y (NPY) 933
anorexigénico 933
hormona α estimuladora de los melanocitos (α-MSH) 933
JAK (Janus quinasa) 934
STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) 934
proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) 934
adiponectina 935
mTORC1 936
PPAR (receptor peroxisómico activado por proliferador) 937
grelina 938
PYY_{3-36} 938
endocannabinoides 939
probióticos 940
prebióticos 940
síndrome metabólico 941
tiazolidinodionas 942

COPY-STATION

Problemas

1. Actividad de hormonas peptídicas Explique por qué dos hormonas peptídicas tan parecidas estructuralmente tales como la oxitocina y la vasopresina pueden tener efectos tan diferentes (véase la Fig. 23-10).

2. ATP y fosfocreatina como fuentes de energía para el músculo Durante la contracción muscular, la concentración de fosfocreatina en el músculo esquelético cae mientras la concentración de ATP se mantiene bastante constante. Sin embargo, Robert Davies halló, en un experimento clásico, que si el músculo era previamente tratado con 1-flúor-2,4-dinitrobenceno (FDNB p. 98), la concentración de ATP disminuía rápidamente, mientras que la concentración de fosfocreatina permanecía inalterada durante una serie de contracciones. Sugiera una explicación.

3. Metabolismo del glutamato en el cerebro El tejido cerebral capta el glutamato de la sangre y lo transforma en glutamina que libera a la sangre. ¿Qué se consigue con esta transformación metabólica? ¿Cómo se produce? De hecho, el cerebro puede generar más glutamina de la que se puede fabricar a partir del glutamato que llega de la sangre. ¿Cómo se forma esta glutamina extra? (Sugerencia: puede ser útil revisar el catabolismo de los aminoácidos en el Capítulo 18; recuerde que el NH_4^+ es muy tóxico para el cerebro.)

4. Las proteínas como combustible durante el ayuno Cuando se catabolizan las proteínas musculares en el músculo esquelético durante un ayuno ¿cuál es el destino de los aminoácidos?

5. Ausencia de glicerol quinasa en el tejido adiposo El glicerol 3-fosfato es necesario para la biosíntesis de los triacilgliceroles. Los adipocitos, que están especializados en la síntesis y degradación de TAG, no pueden utilizar directamente el glicerol, puesto que carecen de glicerol quinasa, que cataliza la reacción

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicerol 3-fosfato} + \text{ADP}$$

¿Cómo consigue el tejido adiposo el glicerol 3-fosfato necesario para la síntesis de TAG?

6. Consumo de oxígeno durante el ejercicio Un adulto sedentario consume alrededor de 0,05 L de O_2 en 10 segundos. Un esprínter en una carrera de 100 m lisos consume alrededor de 1 L de O_2 en el mismo tiempo. Una vez acabada la carrera, el esprínter sigue respirando a un ritmo elevado (pero que disminuye gradualmente) durante unos minutos, consumiendo unos 4 L de O_2 **más** que el individuo sedentario.

(a) ¿Por qué las necesidades de O_2 aumentan drásticamente durante la carrera?

(b) ¿Por qué la demanda de O_2 se mantiene elevada una vez finalizada la carrera?

7. Carencia de tiamina y funciones cerebrales Los individuos con deficiencia de tiamina muestran una serie de manifestaciones neurológicas características: pérdida de reflejos, ansiedad y confusión mental. Sugiera una explicación de por qué la deficiencia de tiamina se manifiesta con alteraciones de la función cerebral.

8. Potencia hormonal En condiciones normales, la médula suprarrenal humana secreta adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$) a un ritmo suficiente para mantener una concentración de 10^{-10} M en la sangre circulante. Para apreciar lo que significa esta concentración, calcule el diámetro de una piscina redonda, con una profundidad de 2,0 m, necesario para disolver 1,0 g (aproximadamente 1 cucharilla de café) de adrenalina a una concentración igual a la sanguínea.

9. Regulación de los niveles hormonales en sangre La vida media de la mayor parte de hormonas en la sangre es relativamente corta. Por ejemplo, si se inyecta insulina marcada radiactivamente a un animal, al cabo de 30 min la mitad de la hormona marcada ha desaparecido de la sangre.

(a) ¿Cuál es la importancia de la inactivación relativamente rápida de las hormonas circulantes?

(b) A la vista de esta rápida inactivación, ¿cómo puede mantenerse constante el nivel de hormonas circulantes en condiciones normales?

(c) ¿De qué manera puede conseguir el organismo unos cambios rápidos en los niveles de una hormona circulant?

10. Hormonas hidrosolubles frente a hormonas liposolubles Según sus propiedades físicas, las hormonas se catalogan en dos categorías: las que son muy solubles en agua pero relativamente insolubles en lípidos (p. ej., la adrenalina) y las que son relativamente insolubles en agua pero muy solubles en lípidos (p. ej. las hormonas esteroides). La mayor parte de las hormonas hidrosolubles no entran en el interior de sus células diana para ejercer su papel de reguladoras de la actividad celular. Las hormonas liposolubles, por el contrario, entran en sus células diana y finalmente ejercen su acción en el núcleo. ¿Cuál es la correlación entre la solubilidad, la localización de los receptores y el modo de acción de las dos clases de hormonas?

11. Diferencias metabólicas en el músculo y en el hígado en una situación de "luchar o huir" Cuando un animal afronta una situación de "luchar o huir" la liberación de adrenalina pone en marcha la degradación de glucógeno en el hígado, corazón y músculo esquelético. El producto final de la degradación del glucógeno en el hígado es la glucosa; el producto final en el músculo esquelético es el piruvato.

(a) ¿Por qué se observan diferentes productos de degradación del glucógeno en los dos tejidos?

(b) ¿Cuál es la ventaja para el organismo en una situación de "luchar o huir" de tener estas rutas específicas para la degradación del glucógeno?



12. Exceso de secreción de insulina: hiperinsulinismo Ciertos tumores malignos del páncreas provocan una producción excesiva de insulina por las células β. Los individuos afectados manifiestan estremecimientos y temblores, debilidad y cansancio, sudoración y hambre.

(a) ¿Cuál es el efecto del hiperinsulinismo en el metabolismo hepático de los glúcidos, aminoácidos y lípidos?

(b) ¿Cuáles son las causas de los síntomas observados? Sugiera por qué si se prolonga esta situación da lugar a lesiones cerebrales.

13. Termogénesis causada por las hormonas tiroideas Las hormonas tiroideas están íntimamente implicadas en la regulación del metabolismo basal. El tejido hepático de animales tratados con un exceso de tiroxina muestra un aumento de la tasa de consumo de O_2 y un aumento de la producción de calor (termogénesis), pero la concentración de ATP en el tejido es normal. Se han propuesto diferentes explicaciones para el efecto termogénico de la tiroxina. Una de ellas supone que el exceso de tiroxina provoca un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. ¿Cómo podría tal efecto explicar estas observaciones? Otra explicación sugiere que la termogénesis es debida a un incremento en la velocidad de utilización del ATP por el tejido estimulado por la tiroxina. ¿Es ésta una explicación razonable? ¿Por qué?

14. Función de las prohormonas ¿Cuáles son las posibles ventajas de la síntesis de hormonas como prohormonas?

15. Fuentes de glucosa durante la inanición Un adulto humano típico consume unos 160 g de glucosa diarios, de los cuales 120 g son utilizados por el cerebro. Las reservas disponibles de glucosa son suficientes para un día (~ 20 g de glucosa circulante y ~ 190 g de glucógeno). Una vez agotadas las reservas durante la inanición, ¿cómo podría obtener el cuerpo más glucosa?

16. Ratones parabióticos *ob/ob* Mediante cirugía cuidadosa es posible conectar los sistemas circulatorios de dos ratones, de manera que la misma sangre circule a través de los dos animales. En estos ratones **parabióticos**, los productos liberados en la sangre de un animal alcanzan al otro animal a través de la circulación compartida. Ambos animales pueden comer independientemente. Cuando un ratón mutante *ob/ob* (con ambas copias del gen *OB* defectuosas) y un ratón normal *OB/OB* (dos copias normales del gen *OB*) se conviertan en parabióticos, ¿qué sucederá con el peso de cada ratón?

17. Cálculo del índice de masa corporal Un corpulento profesor de bioquímica pesa 118 kg y mide 173 cm. ¿Cuál es su

índice de masa corporal? ¿Cuánto peso debería perder para disminuir el índice de masa corporal hasta 25 (normal)?

18. Secreción de insulina Prediga los efectos sobre la secreción de insulina por las células β pancreáticas de la exposición al ionóforo de potasio valinomicina (Fig. 11-42). Explique su predicción.

19. Efectos de la eliminación de un receptor de insulina Una cepa de ratones que carece específicamente del receptor de insulina del hígado muestra una ligera hiperglucemia en condiciones de ayuno (glucosa sanguínea = 132 mg/dL, vs. 101 mg/dL en los controles) y una más acusada hiperglucemia con alimentación normal (glucosa = 363 mg/dL, vs. 135 mg/dL en los controles). Los ratones tienen niveles anormalmente elevados de glucosa 6-fosfatasa en el hígado y niveles elevados de insulina en la sangre. Explique estas observaciones.

20. Decisiones sobre la seguridad de fármacos El fármaco Avandia (rosiglitazona) resulta efectivo para disminuir la glucosa sanguínea en pacientes con diabetes tipo 2, pero unos pocos años después de que se utilizara ampliamente pareció que la utilización del fármaco comportaba un aumento del riesgo de ataque cardíaco. La respuesta de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos fue restringir de manera muy estricta las condiciones bajo las que se podía recetar. Dos años más tarde, después de que se completaran estudios adicionales la FDA levantó las restricciones y, hoy en día, Avandia está disponible con receta médica en los Estados Unidos sin limitaciones especiales. No obstante, en muchos países está completamente prohibido. Si tuviese la responsabilidad de decidir si este fármaco debería permanecer en el mercado (con las indicaciones pertinentes acerca de sus efectos secundarios) o ser retirado, ¿qué factores tendría en cuenta para tomar la decisión?

21. La medicación en la diabetes tipo 2 Los fármacos acarbosa (Precose) y miglitol (Glyset), utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 inhiben las α-glucosidasas del borde en cepillo del intestino delgado. Estos enzimas degradan los oligosacáridos derivados del glucógeno y del almidón a monosacáridos. Sugiera un posible mecanismo para el efecto beneficioso de estos fármacos en los individuos con diabetes. ¿Qué efectos secundarios, si los hubiere, esperaría de estos fármacos? ¿Por qué? (Sugerencia: Revise la intolerancia a la lactosa, p. 551).

Problema de análisis de datos

22. Clonaje del receptor de la sulfonilurea de las células β pancreáticas El gliburide, un miembro de la familia de fármacos de la sulfonilurea, mostrado en la p. 933, se usa para tratar la diabetes tipo 2. Se une al canal de K^+ regulado por ATP, mostrado en las figuras 23-28 y 23-29 cerrándolo.

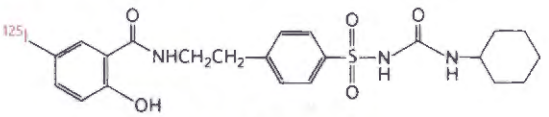
(a) A la vista del mecanismo mostrado en la Figura 23-28 ¿el tratamiento con gliburide resultaría en un aumento o en una disminución de la secreción de insulina por las células β pancreáticas? Explíquelo.

(b) ¿De qué manera el tratamiento con gliburide ayuda a reducir los síntomas de la diabetes tipo 2?

(c) ¿Esperaría que el gliburide fuese útil en el tratamiento de la diabetes tipo 1? Explique su respuesta.

Aguilar-Bryan y colaboradores (1995) clonaron el gen del receptor de la sulfonilurea de la porción del canal regulado por ATP (SUR) del hamster. El equipo de investigadores invirtió muchos esfuerzos para asegurar que el gen clonado fuese efectivamente el que codificaba el SUR. Discutiremos cómo es posible demostrar que se ha clonado realmente el gen buscado y no un gen distinto.

El primer paso consistió en obtener la proteína SUR pura. Ya se sabía que fármacos como el gliburide se unían a SUR con gran afinidad (K_d < 10 nM), y que SUR tenía una masa molecular entre 140 y 170 kDa. Aguilar-Bryan y colaboradores aprovecharon la gran afinidad del gliburide para marcar la proteína SUR radiactivamente y así purificarla a partir de un extracto celular. En primer lugar, prepararon un derivado del gliburide marcado con yodo radiactivo (^{125}I):



[^{125}I]5-Yodo-2-hidroxigliburide

(d) Estudios preliminares mostraron que el derivado del gliburide marcado con ^{125}I (en adelante [^{125}I]gliburide) tenía la misma K_d y propiedades de unión que el gliburide no modificado ¿Por qué era necesario demostrar esto? (¿Qué posibilidades alternativas quedaban descartadas?)

Aunque [^{125}I]gliburide se unió a SUR con gran afinidad, una cantidad significativa del fármaco marcado probablemente se disociaría de SUR durante la purificación. Para evitarlo había que entrecruzar covalentemente el [^{125}I]gliburide con SUR. Hay muchos métodos para el entrecruzamiento covalente; Aguilar-Bryan y colaboradores usaron luz UV. Cuando las moléculas aromáticas se exponen a luz UV de longitud de onda corta pasan a un estado excitado que forma fácilmente enlaces covalentes con las moléculas vecinas. El entrecruzamiento del gliburide marcado radiactivamente con la proteína SUR permitió seguir SUR a lo largo del proceso de purificación simplemente siguiendo la radiactividad del ^{125}I.

Aguilar-Bryan y colaboradores trataron células HIT de hámster (que expresan SUR) con [^{125}I]gliburide y luz UV, purificaron la proteína de 140 kDa marcada con ^{125}I y secuenciaron su segmento amino-terminal de 25 aminoácidos; encontraron la secuencia PLAFCGTENHSAAYRVDQGVLNNGC. A continuación, generaron anticuerpos que se unían a dos péptidos cortos de esta secuencia, uno a PLAFCGTE y el otro a HSAAYRVDQGV, y mostraron que estos anticuerpos se unían a la proteína purificada de 140 kDa marcada con ^{125}I.

(e) ¿Por qué era necesario incluir este paso de unión a los anticuerpos?

A continuación se diseñaron cebadores para PCR basados en las secuencias anteriores y clonaron un gen a partir de una genoteca de cDNA de hámster que codificaba una proteína con estas secuencias (véase el Capítulo 9 para los métodos de la biotecnología). El cDNA clonado del supuesto *SUR* hibridaba con un mRNA de la longitud apropiada presente en las células que contenían SUR. El cDNA del supuesto *SUR* no hibridaba con ninguna fracción de mRNA del mRNA aislado de hepatocitos que no expresan SUR.

(f) ¿Por qué era necesario incluir la etapa de hibridación entre el cDNA del supuesto *SUR* con el mRNA?

Finalmente, el gen clonado fue introducido y expresado en células COS, que normalmente no expresan el gen *SUR*. A las células se les añadió [^{125}I]gliburide con o sin un gran exceso de gliburide no marcado, se expusieron las células a la luz UV y se midió la radiactividad de la proteína de 140 kDa obtenida. Los resultados se muestran en la tabla

Copy Station

Experimento	Tipo celular	¿cDNA del supuesto SUR añadido?	¿Exceso de gliburida no marcada?	Marcaje con ^{125}I en la proteína de 140 kDa
1	HIT	No	No	+ + +
2	HIT	No	Sí	–
3	COS	No	No	–
4	COS	Sí	No	+ + +
5	COS	Sí	Sí	–

(g) ¿Por qué no se encontró proteína de 140 kDa marcada con ^{125}I en el experimento 2?

(h) ¿Cómo usaría la información de la tabla para argumentar que el cDNA codificaba SUR?

(i) ¿De qué otra información le gustaría disponer para asegurar haber clonado el gen *SUR*?

Referencia

Aguilar-Bryan, L., C.G. Nichols, S.W. Wechsler, J.P. Clement, IV, A.E. Boyd, III, G. González, H. Herrera-Sosa, K. Nguy, J. Bryan, and D.A. Nelson. 1995. Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423–426.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

COPY-STATION

PARTE III

LAS RUTAS DE LA INFORMACIÓN

24 Genes y cromosomas 951
25 Metabolismo del DNA 979
26 Metabolismo del RNA 1027
27 Metabolismo de las proteínas 1069
28 Regulación de la expresión génica 1119

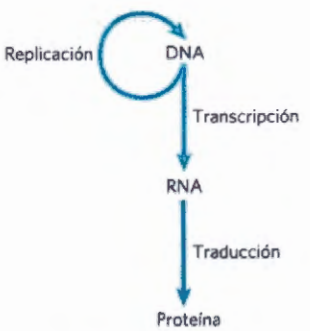
Copyright

La tercera y última parte de este libro explora los mecanismos bioquímicos subyacentes a las exigencias aparentemente contradictorias entre la estabilidad genética y la evolución de los organismos vivos. ¿Cuál es la naturaleza molecular del material genético? ¿De qué modo se transmite con fidelidad la información genética de generación en generación? ¿Cuál es el origen de los escasos cambios del material genético que son la materia prima de la evolución? ¿Cómo se expresa en último término la información genética en las secuencias de aminoácidos de la enorme variedad de moléculas proteicas de las células vivas?

El conocimiento actual de las rutas de la información es el resultado de la convergencia de la genética, la física y la química en la bioquímica moderna. El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA por James Watson y Francis Crick en 1953 (véase la Figura 8-13) es paradigmático. La teoría genética aportó el principio de que la codificación de la información corre a cargo de los genes. La física hizo posible la determinación de la estructura molecular por análisis de difracción de rayos X. La química desveló la composición del DNA. El profundo impacto de la hipótesis de Watson y Crick se debió a que fue capaz de integrar una amplia variedad de observaciones procedentes de estas diversas disciplinas.

Semejante revolución en la comprensión de la estructura del DNA inevitablemente planteó numerosas preguntas sobre su función. La propia estructura del DNA en doble hélice sugirió un mecanismo para su copia, de modo que la información en él contenida pudiera ser transmitida de generación en generación. La comprensión de cómo la información del DNA se convierte en proteínas funcionales vino con el descubrimiento del RNA mensajero y el RNA de transferencia y con la elucidación del código genético.

Estos y otros importantes avances llevaron a la formulación del dogma central de la biología molecular, que comprende los tres principales procesos celulares



Dogma central de la biología molecular con indicación del sentido de los flujos de información en la replicación, la transcripción y la traducción. El término "dogma" es inadecuado y sólo se mantiene por razones históricas. Empleado por primera vez por Francis Crick, en un momento en que se disponía de pocas pruebas en favor de estas ideas, el "dogma" se ha convertido es un principio perfectamente establecido.

en los que se utiliza la información genética. El primero es la replicación, o copia del DNA parental para formar moléculas de DNA hijas con idéntica secuencia de nucleótidos. El segundo es la transcripción, proceso mediante el cual parte del mensaje genético codificado por el DNA es copiado en forma de RNA. El tercero es la traducción, en la que el mensaje genético codificado en el RNA mensajero es traducido en los ribosomas para dar un polipéptido con una secuencia específica de aminoácidos.

La Parte III estudia estos y otros procesos relacionados. En el Capítulo 24 se examina la estructura, topología y empaquetamiento de los cromosomas y los genes. Los procesos relacionados con el dogma central se examinan en los Capítulos 25 a 27. Finalmente, se aborda la regulación, examinando como se controla la expresión de la información genética (Capítulo 28).

Un tema de gran importancia, presente a lo largo de estos capítulos, es la complejidad añadida inherente a la biosíntesis de las macromoléculas que contienen información. La síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas con sus secuencias específicas de nucleótidos y aminoácidos debe respetar estrictamente nada menos que las características del molde en que está basada la propia vida. La formación de los enlaces fosfodiéster en el DNA o de los enlaces peptídicos en las proteínas podría parecer una tarea trivial para las células, a la vista del arsenal de medios enzimáticos y químicos descrito en la Parte II de este libro. No obstante, cuando se trata de considerar los procesos que tienen relación con el tratamiento de la información, debe ampliarse el repertorio de modelos y de reglas establecido al considerar las vías metabólicas. En los biopolímeros implicados en el tratamiento de la información genética, los enlaces deben formarse entre *determinadas* subunidades, evitando tanto los errores de secuencia como su propagación. Ello tiene un impacto enorme en la termodinámica, la química y la enzimología de los procesos biosintéticos. La formación de un enlace peptídico requiere un aporte de sólo unos 21 kJ/mol y puede ser catalizado por enzimas relativamente simples. En cambio, para sintetizar un enlace entre dos aminoácidos específicos en un punto concreto de una cadena polipeptídica, la célula invierte unos 125 kJ/mol de energía química y utiliza más de 200 enzimas, moléculas de RNA y proteínas especializadas. La química que interviene en la formación del enlace peptídico no cambia a causa de estos requerimientos, pero la reacción básica está acompañada por procesos adicionales para asegurar que el enlace peptídico se forme entre aminoácidos determinados. La información biológica es cara.

La interacción dinámica entre ácidos nucleicos y proteínas es otro tema central de la Parte III. Moléculas catalíticas y reguladoras de RNA ocupan cada vez más un lugar prominente en nuestro conocimiento de estas rutas (descritas en los Capítulos 26 y 27). Sin embargo, la mayoría de los procesos que constituyen las rutas por las que fluye la información en las células están catalizados y regulados por proteínas. La comprensión del modo de actuación de estos enzimas y otras proteínas puede tener un valor tanto teórico como práctico, puesto que constituye la base del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante (introducida en el Capítulo 9).

Una vez más la evolución constituye un tema panorámico. Muchos de los procesos esbozados en la Parte III se remontan miles de millones de años atrás, y unos pocos hasta el LUCA, el último antepasado común universal. El ribosoma, gran parte del aparato de traducción y algunas partes de la maquinaria de transcripción son compartidos por todos los organismos vivos de este planeta. La información genética tiene las características de un reloj molecular que puede ayudar a definir las relaciones ancestrales entre especies. Las rutas de la información compartidas conectan a los humanos con todas las especies presentes en la tierra y con todas las especies que les precedieron. La exploración de estas rutas esta permitiendo levantar lentamente el telón sobre el primer acto: los sucesos que pudieron anunciar el principio de la vida sobre la tierra.

Copy-station

CAPÍTULO 24

Genes y cromosomas

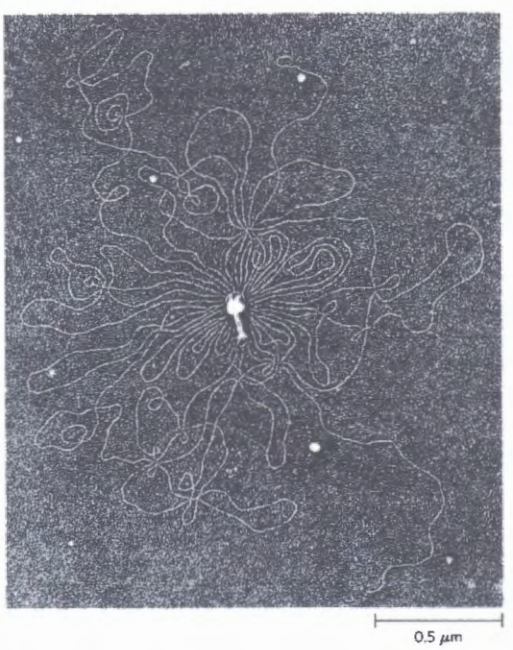
Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

24.1 Componentes cromosómicos 951

24.2 Superenrollamiento del DNA 957

24.3 La estructura de los cromosomas 966

El tamaño de las moléculas de DNA plantea un interesante problema biológico, pues su longitud es generalmente mucho mayor que las células o los virus que las contienen **(Fig. 24-1)**. ¿Cómo se empaqueta el DNA en los virus y en las células? Para responder a esta pregunta desplazaremos nuestra atención de la estructura secundaria del DNA, examinada en el Capítulo 8, al enorme grado de organización requerido por el empaquetamiento terciario del DNA en los **cromosomas,** que almacenan la información genética. En primer lugar, examinaremos los elementos constituyentes de los cromosomas víricos y celulares, así como su tamaño y organización. A continuación, abordaremos la topología del DNA, con el propósito de describir el enrollamiento y el superenrollamiento de las moléculas de DNA. Consideraremos en último lugar las interacciones proteína-DNA que hacen posible la organización de los cromosomas en estructuras compactas.



24.1 Componentes cromosómicos

El DNA celular contiene genes y regiones intergénicas. Ambos tipos de DNA desempeñan funciones vitales para la célula. Los genomas más complejos de las células eucarióticas requieren niveles superiores de organización, cuyos detalles estructurales son observables en los cromosomas. Empezaremos examinando los diferentes tipos de secuencias de DNA y los elementos estructurales de los cromosomas.

Los genes son segmentos de DNA que codifican cadenas polipeptídicas y RNA

Nuestra comprensión de los genes ha evolucionado enormemente a lo largo del siglo pasado. Según la biología clásica, un gen es una parte de un cromosoma que determina o afecta un solo carácter **fenotípico** (propiedad visible), como, por ejemplo, el color de los ojos. George Beadle y Edward Tatum propusieron en 1940 una definición molecular del gen. Estos investigadores expusieron esporas del moho *Neurospora crassa* a los rayos X y otros agentes causantes de lesiones y alteraciones de la secuencia del DNA **(mutaciones).** Encontraron que algunas cepas fúngicas mutantes eran deficientes en algún enzima específico, lo que en ocasiones provocaba la paralización completa de una ruta metabó-

FIGURA 24-1 Cápsida proteica del bacteriófago T2 rodeada por su única molécula lineal de DNA. La lisis del bacteriófago con agua destilada libera el DNA que se esparce sobre la superficie del agua. Una partícula de bacteriófago T2, sin dañar, consiste en una cabeza que se prolonga en una cola, mediante la que el bacteriófago se adhiere a la superficie externa de una célula bacteriana. La totalidad del DNA que se muestra en esta micrografía electrónica se encuentra empaquetado dentro de la cabeza del fago.[Fuente; Reproducido con permiso de Elsevier de "Preparation and length measurements of the total deoxyribonucleic acid content of T2 bacteriophages," por A.K. Kleinschmidt et al. *Biochem Biophys Acta* 61, pp 857-864, 1962; permiso conseguido a través de Copyright Clearance Center Inc.]

lica entera. Estas observaciones hicieron que Beadle y Tatum llegaran a la conclusión de que un gen es un segmento de material genético que determina o codifica un enzima: la hipótesis de **un gen-un enzima**. Más tarde este concepto fue ampliado a **un gen-un polipéptido**, puesto que muchos genes codifican proteínas no enzimáticas, o un polipéptido de una proteína con múltiples subunidades.



George W. Beadle, 1903-1989 [Fuente: National Library of Medicine/Science Photo Library/Science Source.]



Edward L. Tatum, 1909-1975 [Fuente: Corbis/UPI/Bettmann/Corbis.]

La definición bioquímica actual de gen es todavía más precisa. Un **gen** es todo el DNA que codifica la secuencia primaria de un producto génico final, sea un polipéptido o un RNA, con una función estructural o catalítica. El DNA contiene también otros segmentos o secuencias con función puramente reguladora. Las **secuencias reguladoras** actúan de señales que permiten identificar el principio o el final de los genes, influir en la transcripción de genes o funcionar como puntos de inicio de la replicación o la recombinación (Capítulo 28). Algunos genes pueden expresarse de formas diversas para generar múltiples productos génicos a partir de un segmento de DNA. Los mecanismos especiales de transcripción y traducción que lo hacen posible se describen en los Capítulos 26 a 28.

El tamaño mínimo global de los genes que codifican proteínas puede calcularse directamente. Tal como se describirá en detalle en el Capítulo 27, cada aminoácido de una cadena polipeptídica está codificado por una secuencia de tres nucleótidos consecutivos en una de las cadenas del DNA **(Fig. 24-2)**. Estos "codones" están dispuestos en una secuencia que corresponde a la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por el gen. A una cadena polipeptídica de tamaño medio de 350 residuos aminoácidos le corresponderían 1.050 pb del DNA. Muchos genes de los eucariotas y unos pocos de las bacterias y las arquea se hallan interrumpidos por segmentos de DNA no codificante y son, por tanto, considerablemente más largos que el tamaño sugerido por este simple cálculo.

¿Cuántos genes hay en un solo cromosoma? El cromosoma de *Escherichia coli*, uno de los genomas bacterianos completamente secuenciados, es una molécula de DNA circular (en el sentido de un bucle sin extremos y no de un círculo perfecto) de 4.639.675 pb, que codifican unos 4.300 genes de proteínas y otros 157 genes de moléculas de RNA estructural o catalítico. En los eucariotas, el genoma humano de unos 3.100 millones de pares de bases contiene unos 20.000 genes repartidos en 24 cromosomas diferentes.

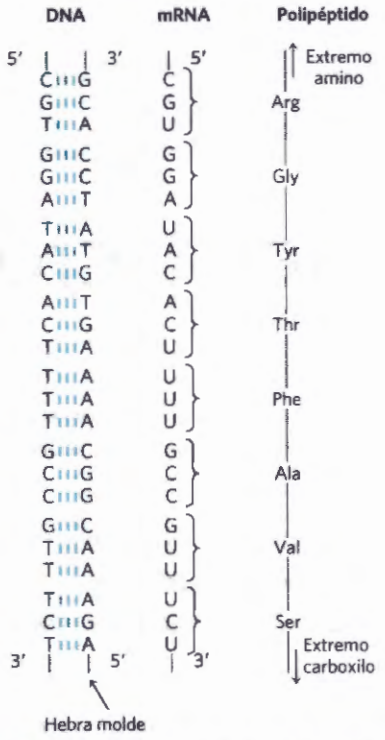


FIGURA 24-2 Colinealidad de las secuencias codificantes de nucleótidos del DNA y el mRNA y la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. Los tripletes de nucleótidos del DNA determinan los aminoácidos de las proteínas con la mediación del mRNA. Una de las cadenas del DNA sirve de molde para la síntesis del mRNA, cuyos tripletes de nucleótidos (codones) son complementarios de los del DNA. En algunos genes bacterianos y en muchos eucarióticos, las secuencias codificantes están interrumpidas por secuencias no codificantes (denominadas intrones).

COPYSTATION

Las moléculas de DNA son mucho más largas que las células o virus que las contienen

Los DNA cromosómicos son, a menudo, muchos órdenes de magnitud más largos que las células o virus que los contienen (Fig. 24-1; Tabla 24-1). Ello es así para todas las clases de organismos y parásitos víricos.

Virus Los virus no son organismos de vida libre; al contrario, son parásitos infecciosos que aprovechan los recursos de una célula huésped para realizar muchos de los procesos que requiere su propagación. Muchas partículas víricas consisten solamente en un genoma (normalmente una única molécula de RNA o DNA) envuelto por una envoltura proteica.

Prácticamente todos los virus vegetales y algunos virus bacterianos y animales contienen RNA. Estos genomas son generalmente muy pequeños. Por ejemplo, los genomas de los retrovirus de los mamíferos, tales como el VIH, tienen unos 9.000 nucleótidos y el del bactriófago $Q\beta$ tiene 4.220 nucleótidos. Ambos virus tienen genomas de RNA de cadena sencilla.

Los genomas de los virus de DNA tienen tamaños muy variados (Tabla 24-1). Muchos DNA víricos son circulares durante al menos una parte de su ciclo vital. Durante la replicación vírica en el interior de una célula huésped pueden aparecer tipos específicos de DNA vírico denominados **formas replicativas**; los DNA

TABLA 24-1 Tamaño del DNA y de las partículas de algunos virus bacterianos (bacteriófagos)

Virus	Tamaño del DNA viral (pb)	Longitud del DNA viral (nm)	Dimensión mayor de la partícula vírica (nm)
ϕX174	5.386	1.939	25
T7	39.936	14.377	78
λ (lambda)	48.502	17.460	190
T4	168.889	60.800	210

Nota: Los datos sobre el tamaño del DNA corresponden a la forma replicativa (doble hebra). La longitud de contorno se calcula suponiendo que cada par de bases tiene un espesor de 3,4 Å (véase la Fig. 8-13).

lineales, por ejemplo, suelen circularizarse y todos los DNA monocatenarios se convierten en doble cadena. El bacteriófago λ (lambda) es un virus típico de DNA de tamaño mediano que infecta *E. coli*. En su forma replicativa en el interior de las células, el DNA de λ es una doble hélice circular. Este DNA de doble cadena contiene 48.502 pb y tiene una longitud de contorno de 17,5 μm. El bacteriófago φX174 es un virus de DNA mucho más pequeño; el DNA de una partícula vírica de φX174 es un círculo monohebra. Su forma replicativa de doble hebra contiene 5.386 pb. Aunque los genomas víricos son pequeños, las longitudes de contorno de sus DNA son centenares de veces más largas que la dimensión más larga de las partículas víricas que los contienen (Tabla 24-1).

Bacterias Una única célula de *E. coli* contiene casi 100 veces más DNA que una partícula de bacteriófago λ. El cromosoma de una célula de *E. coli* es una única molécula de DNA circular de doble hebra. Sus 4.639.675 pb tienen una longitud de contorno de aproximadamente 1,7 mm, unas 850 veces la longitud de una célula de *E. coli* **(Fig. 24-3)**. Además del gran cromosoma de DNA circular en el nucleoide, muchas bacterias contienen una o más pequeñas moléculas de DNA circular que se encuentran libres en el citosol. Estos elementos extracromosómicos se denominan **plásmidos** **(Fig. 24-4**; véase también la p. 324). Los plásmidos tienen generalmente una longitud de unos pocos miles de pares de bases, aunque algunos pueden contener hasta 400.000 pb. Los plásmidos contienen información genética y se replican dando lugar a nuevos plásmidos que se incorporan a las células hijas en el momento de la división celular. Los plásmidos se han encontrado en levaduras y otros tipos de hongos así como en las bacterias.

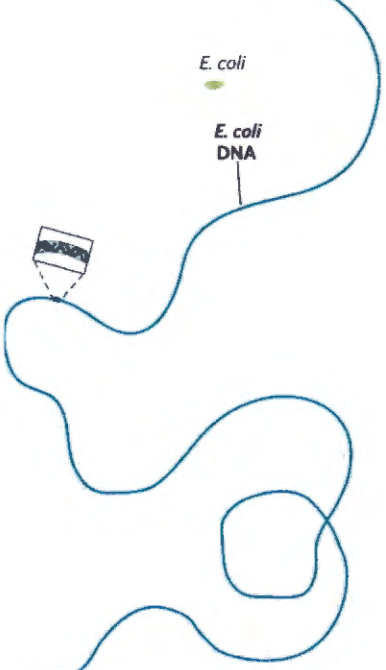
En muchos casos, los plásmidos no aportan ninguna ventaja aparente al huésped y su única función parece ser la autopropagación. Algunos plásmidos, sin embargo, son portadores de genes útiles para la bacteria huésped. Por ejemplo, algunos genes plasmídicos confieren resistencia frente a agentes antibacterianos. Los plásmidos que contienen el gen del enzima β-lactamasa confieren resistencia a antibióticos del tipo β-lactama, tales como la penicilina, la ampicilina y la amoxicilina (véase la Fig. 6-32). Estos y otros plásmidos similares pueden pasar de una célula resistente a una célula sensible a los antibióticos, de la misma o de diferente especie bacteriana, convirtiendo en resistente a la célula receptora. El amplio uso de antibióticos en algunas poblaciones humanas ha actuado como una potente fuerza selectiva que ha favorecido la difusión de plásmidos portadores de resistencia a antibióticos en las bacterias patógenas (así como de elementos transponibles, descritos más adelante, que contienen genes similares). Los médicos son cada vez más reacios a recetar antibióticos, a no ser que sea clínicamente indispensable. Por razones similares, se ha limitando el uso de antibióticos en la alimentación animal.

Eucariotas Una célula de levadura, uno de los eucariotas más sencillos, tiene 2,6 veces más DNA que una célula de *E. coli* (Tabla 24-2). Las células de *Drosophila*, la mosca del vinagre usada en estudios genéticos clásicos, contienen 35 veces más DNA que las de *E. coli* y las células humanas tienen casi 700 veces más. Las células de muchas plantas y anfibios contienen todavía más DNA. El material genético de las células eucarióticas está repartido entre varios cromosomas, cuyo número diploide ($2n$) depende de la especie (Tabla 24-2). Las células humanas somáticas tienen, por ejemplo, 46 cromosomas **(Fig. 24-5)**. Cada uno de los cromosomas de una célula eucariótica, como la mostrada en la Figura 24-5a, contiene una única molécula de DNA dúplex muy larga. Las moléculas de DNA de los 24 tipos diferentes de cromosomas humanos (22 parejas análogas más los cromosomas sexuales X e Y) tienen longitudes que varían hasta en un factor de 25. Cada tipo de cromosoma eucariótico contiene un conjunto característico de genes.

La longitud del DNA de un genoma humano extendido (22 cromosomas más un cromososma X y un cromosoma Y o dos cromosomas X) mide alrededor de un metro. La mayoría de células humanas son diploides y, por tanto, contienen un total de 2 m de DNA. Un cuerpo humano adulto contiene unas 10^{14} células y, por tanto, una longitud de DNA de 2×10^{11} km. Compárese esta longitud con la circunferencia de la tierra (4×10^4 km) o con la distancia entre la tierra y el sol ($1{,}5 \times 10^8$ km) para constatar el extraordinario nivel de compactación del DNA de nuestras células.

Las células eucarióticas también tienen organelos, mitocondrias **(Figura 24-6)** y cloroplastos que también contienen DNA. Las moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) son mucho más pequeñas que los cromosomas nucleares. En las células animales el mtDNA contiene menos de 20.000 pb (16.569 pb en el mtDNA humano) y es un dúplex circular. Cada mitocondria contiene normalmente de dos a diez copias de esta molécula de mtDNA, pero su número puede aumentar hasta varios centenares en células embrionarias en pro-

FIGURA 24-3 Una célula bacteriana y su DNA. La longitud del cromosoma de *E coli* (1,7 mm) se representa en forma lineal en relación con la longitud de una célula de *E. coli* (2 ×m).



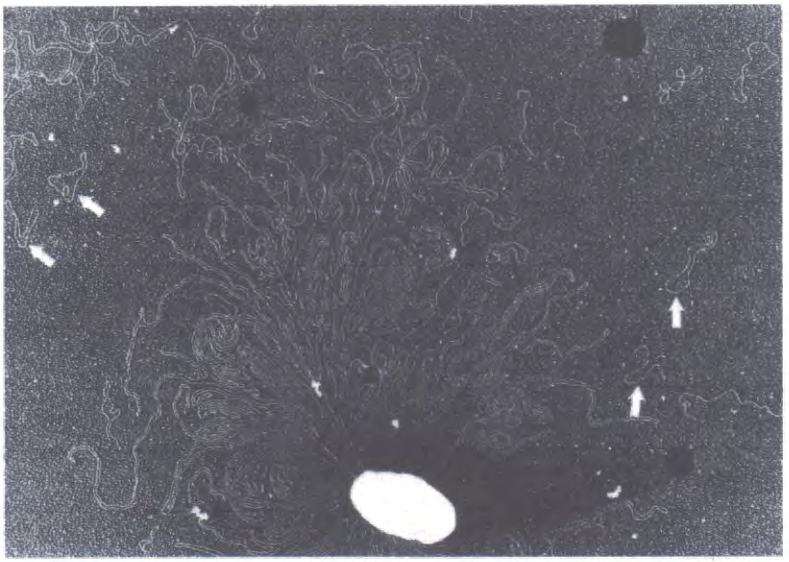


FIGURA 24-4 DNA de una célula lisada de *E. coli*. En esta micrografía electrónica, las flechas blancas indican la localización de varios DNA plasmídicos circulares y de pequeño tamaño. Los puntos negros y las manchas blancas son artefactos de la preparación. Fuente: Huntington Potter University of Colorado School of Medicine and David Dressler, Ballol College, Oxford University.]

Copyright

TABLA 24-2 Contenido en DNA, genes y cromosomas de algunos genomas

	DNA total (pb)	Número de cromosomas*	Número aproximado de genes
Escherichia coli K12 (bacteria)	4.641.652	1	4.494[b]
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	12.157.105	16[c]	6.340[b]
Caenorhabditis elegans (nemátodo)	90.269.800	12[d]	23.000
Arabidopsis thaliana (planta)	119.186.200	10	33.000
Drosophila melanogaster (mosca del vinagre)	120.367.260	18	20.000
Oryza sativa (arroz)	480.000.000	24	57.000
Mus musculus (ratón)	2.634.266.500	40	27.000
Homo sapiens (humanos)	3.070.128.600	46	20.000

Nota: Esta información está siendo constantemente actualizada. Para acceder a los datos más recientes, consulte las web de los proyectos genoma individuales.

*Estos valores corresponden al número diploide de cromosomas excepto en levadura.

† Número haploide de cromosomas. Las cepas salvajes de levadura generalmente poseen ocho (octaploides) o más conjuntos de cromosomas.

* Número de las hembras con dos cromosomas X. Los machos tienen un X pero ningún Y; por tanto, 11 cromosomas en total.



FIGURA 24-5 Cromosomas eucarióticos. (a) Pareja de cromátidas hermanas unidas y condensadas de un cromosoma humano. Los cromosomas eucarióticos tienen esta apariencia en la metafase mitótica. **(b)** Conjunto completo de cromosomas de un leucocito de uno de los autores. Las células somáticas humanas normales tienen 46 cromosomas. [Fuentes: Don W. Fawcett/Science Source. C Michael M. Cox.]

ceso de diferenciación. En unos pocos organismos (por ejemplo, los tripanosomas) cada mitocondria contiene millares de copias de mtDNA organizadas en una compleja matriz entrelazada denominada cinetoplasto. El tamaño del mtDNA de las células vegetales varía entre 200.000 y 2.500.000 pb. Las moléculas de DNA de los cloroplastos (cpDNA) también son dúplex circulares, cuyo tamaño varía entre 120.000 a 160.000 pb. Se ha especulado mucho acerca del origen evolutivo de los DNA de las mitocondrias y los cloroplastos. Un punto de vista ampliamente aceptado supone que se trata de vestigios de los cromosomas de bacterias arcaicas que llegaron hasta el citoplasma de las células huésped y se convirtieron así en los precursores de estos orgánulos (véase la Fig. 1-38). El DNA mitocondrial codifica los tRNAs y rRNAs mitocondriales así como un pequeño número de proteínas mitocondriales. Más del 95% de las proteínas de las mitocondrias están codificadas por el DNA nuclear. Las mitocondrias y los cloroplastos se dividen al dividirse la célula. Su DNA se replica antes y durante la división de estos orgánulos, y las moléculas de DNA hijas pasan a los orgánulos generados durante la división.

Los genes y los cromosomas eucarióticos son muy complejos

Muchas especies bacterianas tienen un solo cromosoma por célula y en prácticamente todos los casos el cromosoma contiene únicamente una copia de cada gen. Unos pocos genes, como los de los rRNA, están repetidos varias veces. Los genes y las secuencias reguladoras ocupan casi todo el DNA en las bacterias. Además, casi todos los genes son exactamente colineales con la secuencia de aminoácidos (o la secuencia de RNA) que codifican (Fig. 24-2).

La organización de los genes en el DNA eucariótico es mucho más compleja, tanto estructural como funcio-

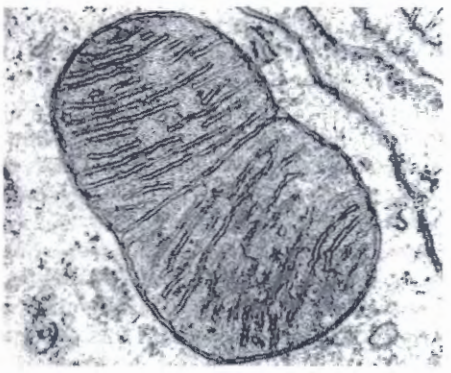


FIGURA 24-6 Una mitocondria en proceso de división. Algunas proteínas y RNA mitocondriales están codificados por una de las copias de DNA mitocondrial (no visible en esta imagen). El DNA mitocondrial (mtDNA) se replica cada vez que se divide la mitocondria, antes de la división celular. [Fuente: Don W. Fawcett/Science Source.]

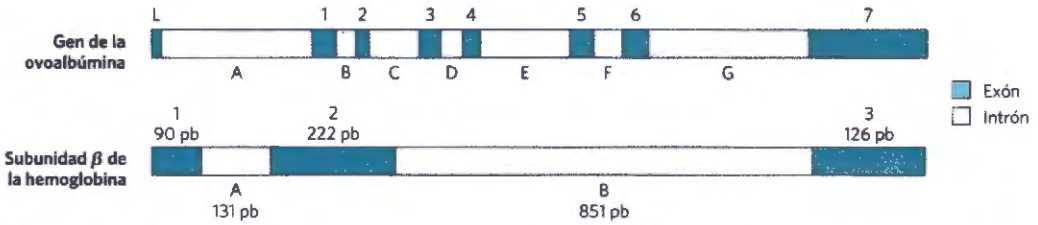


FIGURA 24-7 Intrones de dos genes eucarióticos. El gen de la ovoalbúmina tiene siete intrones (de A a G), que dividen las secuencias codificantes en ocho exones (L, y del 1 al 7). El gen de la subunidad β de la hemoglobina tiene dos intrones y tres exones, incluyendo un intrón que por sí solo contiene más de la mitad de los pares de bases del gen.

nalmente. El estudio de la estructura de los cromosomas eucarióticos y, más recientemente, la secuenciación de genomas eucarióticos enteros han deparado muchas sorpresas. Muchos genes eucarióticos, probablemente la mayor parte, tienen una propiedad estructural característica y sorprendente: sus secuencias de nucleótidos contienen uno o más segmentos intercalados de DNA que no codifican la secuencia de aminoácidos del producto polipeptídico. Estas inserciones no traducidas interrumpen la, por lo demás, precisa relación colineal entre la secuencia de nucleótidos del gen y la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Estos segmentos de DNA génico no traducido se denominan **secuencias intercaladas** o **intrones**, y los segmentos codificantes se denominan **exones**. Pocos genes bacterianos contienen intrones. En los eucariotas superiores, los genes tienen en general más secuencias en los intrones que en los exones. Por ejemplo, en el gen que codifica la única cadena polipeptídica de la proteína del huevo aviar ovoalbúmina **(Fig. 24-7)**, los intrones son mucho más largos que los exones; en total, siete intrones constituyen el 85% del DNA del gen. El gen de la proteína muscular titina se lleva la palma con 178 intrones. Parece que los genes de las histonas no tienen intrones. La función de los intrones no está clara en la mayoría de casos. En total, sólo el 1,5% del DNA humano es "codificante", o exónico, con información para productos proteicos. Sin embargo, cuando los intrones, de mayor tamaño, se incluyen en el cómputo, los genes representan hasta el 30% del genoma humano. Queda mucho trabajo por hacer para entender los otros tipos de secuencias genómicas. Una gran parte del DNA no génico consiste en secuencias repetidas de diferentes tipos, entre las que se encuentran elementos trasponibles (transposones), parásitos moleculares que representan casi la mitad del DNA del genoma humano (véase la Fig 9-29 y los capítulos 25 y 26).

Aproximadamente un 3% del genoma humano consiste en secuencias **altamente repetitivas**, también denominadas **DNA de secuencia simple o repeticiones de secuencia simple (SSR)**. Estas cortas secuencias, generalmente de menos de 10 pares de bases, pueden estar repetidas millones de veces en una célula. El DNA de secuencia simple también ha sido denominado **DNA satélite**, porque su inusual composición de bases hace que migre como bandas "satélite" (separadas del resto del DNA) cuando muestras de DNA celular fragmentado se centrifugan en gradientes de densidad de cloruro de cesio. No parece que el DNA satélite codifique proteínas o RNA. En contraste con los elementos transponibles, el DNA altamente repetitivo puede que tenga una importancia funcional identificable en el metabolismo celular humano, puesto que en buena parte está asociado con dos importantes estructuras de los cromosomas eucarióticos: los centrómeros y los telómeros.

El **centrómero (Fig. 24-8)** consiste en una secuencia de DNA que durante la división celular actúa de punto de unión de las proteínas que fijan el cromosoma a los microtúbulos del huso mitótico. Esta unión resulta esencial para que se produzca la segregación igual y ordenada de los cromosomas entre las células hijas. Se han aislado y estudiado los centrómeros de *Saccharomyces cerevisiae*. Las secuencias esenciales para la función de los centrómeros tienen aproximadamente 130 pares de bases y son muy ricas en pares A=T. Las secuencias centroméricas de los eucariotas superiores son mucho más largas y, a diferencia de las de la levadura, generalmente contienen DNA de secuencia simple, que consiste en miles de copias en tándem de una o unas pocas secuencias cortas de 5 a 10 pb en la misma orientación. Todavía no se conoce el papel exacto del DNA de secuencia simple en la función del centrómero.

Los **telómeros** (del griego *telos*, "extremo") son secuencias con función estabilizadora situadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Los telómeros terminan con múltiples secuencias repetidas de la forma

$$(5')(T_xG_y)_n$$
$$(3')(A_xC_y)_n$$

donde x e y suelen oscilar entre 1 y 4 (Tabla 24-3). El número de repeticiones teloméricas, n, está entre 20 y 100 en el caso de la mayoría de eucariotas unicelulares y es generalmente superior a 1.500 en los mamíferos. Los extremos de una molécula lineal de DNA no pueden ser replicados de forma rutinaria por la maquinaria de replicación celular (ello puede ser una de las causas de

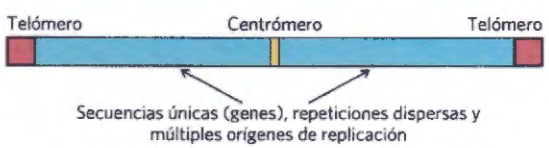


FIGURA 24-8 Elementos estructurales importantes de un cromosoma de levadura.

TABLA 24-3 Secuencias teloméricas

Organismo	Secuencia telomérica repetitiva
Homo sapiens (humanos)	$(TTAGGG)_n$
Tetrahymena thermophila (protozoo ciliado)	$(TTGGGG)_n$
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	$((TG)_{1-3}(TG)_{2-3})_n$
Arabidopsis thaliana (planta)	$(TTTAGGG)_n$

la circularidad de las moléculas de DNA bacteriano). Las secuencias repetidas de los telómeros se añaden a los extremos de los cromosomas principalmente por el enzima telomerasa (véase la Fig. 26-38).

Se han construido cromosomas artificiales (Capítulo 9) con el propósito de comprender mejor el significado funcional de muchas de las características estructurales de los cromosomas eucarióticos. Un cromosoma artificial y lineal requiere para ser razonablemente estable solamente tres componentes: un centrómero, un telómero en cada extremo y las secuencias que permiten el inicio de la replicación del DNA. Los cromosomas artificiales de levadura (YAC; véase la Fig. 9-6) han sido desarrollados respondiendo a los requerimientos de la investigación biotecnológica. Análogamente, se están desarrollando cromosomas artificiales humanos (HAC) para el tratamiento de enfermedades genéticas. Estos sistemas pueden abrir nuevas vías para el reemplazamiento intracelular de productos génicos ausentes o defectuosos o para la terapia génica somática.

COPYRIGHT

RESUMEN 24.1 Elementos cromosómicos

- Los genes son segmentos de un cromosoma que contienen la información para un polipéptido funcional o una molécula de RNA. Además de los genes, los cromosomas contienen diversas secuencias reguladoras implicadas en la replicación, la transcripción y otros procesos.
- El DNA genómico y las moléculas de RNA son generalmente varios órdenes de magnitud más largas que las partículas víricas o las células que los contienen.
- Muchos genes de las células eucarióticas (pero unos pocos de las bacterias y las arquea) están interrumpidos por secuencias no codificantes denominadas intrones. Los segmentos codificantes separados por los intrones se denominan exones.
- Sólo alrededor del 1,5% del DNA genómico humano codifica proteínas. Incluso cuando se incluyen los intrones, los genes representan menos de un tercio del DNA genómico humano. Gran parte del DNA restante consiste en secuencias repetidas de diversos tipos. Los ácidos nucleicos parásitos, conocidos como transposones, representan la mitad del genoma humano.
- Los cromosomas eucarióticos poseen dos importantes secuencias de DNA repetitivo con funciones especiales: los centrómeros, que son los sitios de unión del uso mitótico y los telómeros, localizados en los extremos de los cromosomas.

24.2 Superenrollamiento del DNA

Hemos visto que el DNA celular está altamente compactado, lo cual implica un alto grado de organización estructural. Sin embargo, el mecanismo de plegamiento del DNA debe permitir acceder a la información contenida en el DNA en procesos como la replicación y la transcripción. Antes de considerar estos aspectos, debemos examinar una importante propiedad de la estructura del DNA, conocida como **superenrollamiento**.

El término "superenrollamiento" se refiere al enrollamiento de una hélice. Un hilo de teléfono antiguo es un ejemplo típico de cable enrollado. El trayecto seguido por el hilo entre la base del teléfono y el auricular a menudo presenta una o más superhélices **(Fig. 24-9)**. El DNA está enrollado formando una doble hélice, en la cual ambas cadenas se enrollan alrededor de un eje. El enrollamiento adicional del eje sobre sí mismo **(Fig. 24-10)** produce el superenrollamiento del DNA. Como se detalla más adelante, el superenrollamiento del DNA es generalmente la manifestación de una tensión estructural. Cuando no hay enrollamiento neto del eje del DNA sobre sí mismo, se dice que el DNA se encuentra **relajado**.

Podríamos haber predicho que la compactación del DNA implica alguna forma de superenrollamiento. Quizá no resulte tan previsible que la replicación y la transcripción del DNA y el superenrollamiento se influyan recíprocamente. Tanto la replicación como la transcripción requieren la separación transitoria de las cadenas del DNA, y éste no es un proceso sencillo en una estructura con dos cadenas entrelazadas helicoidalmente (tal como se muestra en la **Fig. 24-11**).

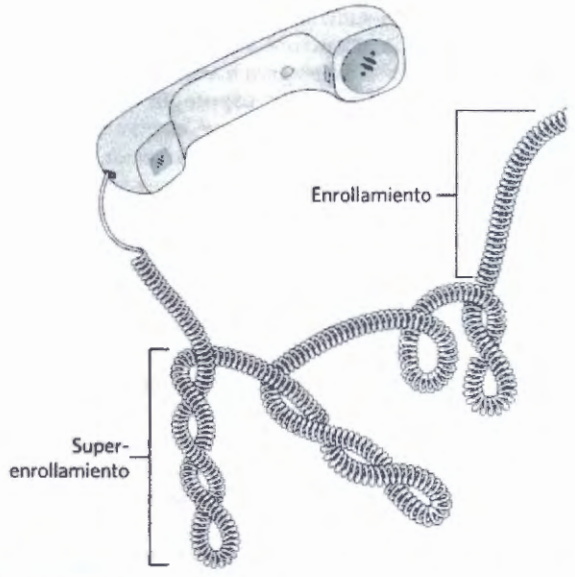


FIGURA 24-9 Superenrollamientos. Un cable de teléfono típico está enrollado como una hélice de DNA y el cable enrollado puede a su vez enrollarse en una superhélice. Este ejemplo es especialmente adecuado, pues el examen de los cables del teléfono ayudó a Jerome Vinograd y colaboradores a comprender que muchas propiedades de los pequeños DNA circulares podían explicarse por el superenrollamiento. Ellos fueron los primeros en descubrir en 1965 la presencia de superenrollamiento en pequeños DNA víricos circulares.

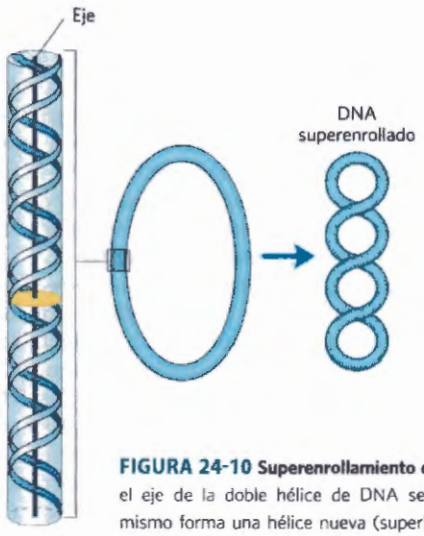


FIGURA 24-10 Superenrollamiento del DNA. Cuando el eje de la doble hélice de DNA se enrolla sobre sí mismo forma una hélice nueva (superhélice). La superhélice de DNA se denomina habitualmente un superenrollamiento.

El superenrollamiento del DNA densamente empaquetado en el núcleo celular parecería lógico y hasta trivial si no fuera por una circunstancia adicional: muchas moléculas de DNA circular siguen estando altamente superenrolladas incluso después de ser extraídas de las células y purificadas de proteínas y otros componentes celulares. Ello demuestra que el superenrollamiento es una característica intrínseca de la estructura terciaria del DNA, que se manifiesta en todos los DNA celulares y que se encuentra estrictamente regulada en todas las células.

Se han determinado varias propiedades medibles del superenrollamiento, y el estudio de las propiedades del superenrollamiento ha permitido aclarar muchos aspectos de la estructura y la función del DNA. Este trabajo se ha basado en gran medida en una rama de las matemáticas denominada **topología**, que estudia las propiedades de los objetos que se mantienen invariables cuando éstos son sometidos a deformaciones continuas. En el caso del DNA, las deformaciones continuas incluyen los cambios conformacionales debidos a las fluctuaciones térmicas o a la interacción con proteínas u otras moléculas. Las deformaciones discontinuas implican la rotura de las cadenas del DNA. Para moléculas de DNA circular, una propiedad topológica es, pues, aquella que no se ve afectada por deformaciones de las cadenas del DNA, con tal que no se produzcan roturas. Las propiedades topológicas se alteran solamente por rotura y posterior empalme de una o ambas cadenas del DNA.

A continuación examinaremos las propiedades fundamentales y las bases físicas del superenrollamiento.

La mayor parte del DNA celular se encuentra subenrollado

Para comprender el superenrollamiento debemos concentrarnos en las propiedades de los DNA circulares de pequeño tamaño, tales como los plásmidos y algunos DNA víricos. Cuando estos DNA no tienen cortes en ninguna de las dos hebras se denominan **DNA circulares cerrados**. Si el DNA que forma la molécula circular cerrada adopta una conformación cercana a la forma B (la estructura de Watson y Crick; véase la Fig. 8-13),

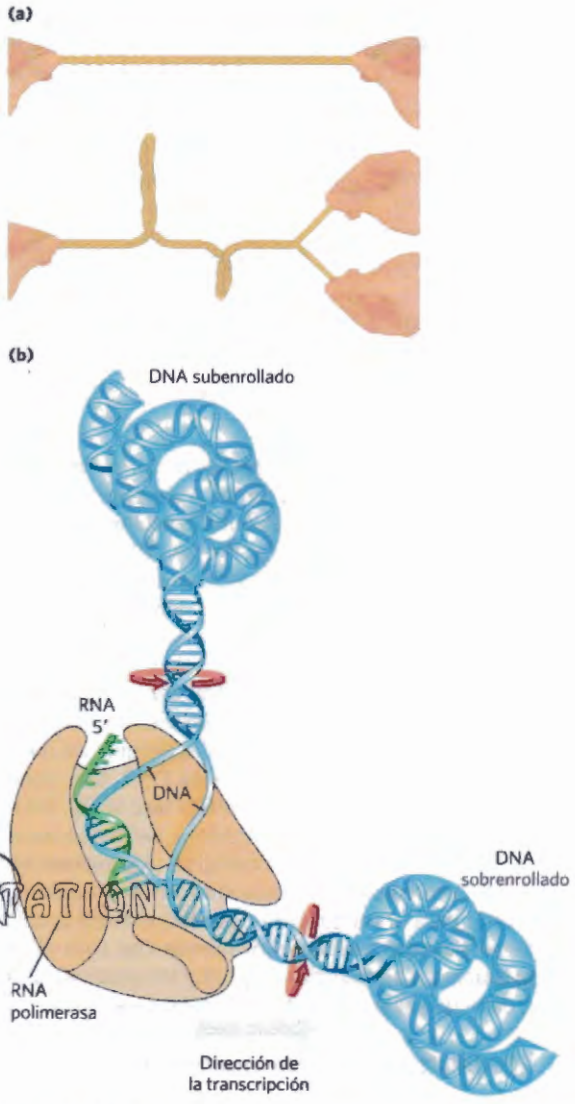


FIGURA 24-11 Efectos de la replicación y de la transcripción sobre el superenrollamiento del DNA. Debido a que el DNA es una estructura en doble hélice, la separación de las hebras provoca tensión adicional y superenrollamiento si el DNA está constreñido (sin libertad de rotación) más allá de la separación de las hebras. **(a)** El efecto general se puede ilustrar enrollando dos tiras de goma para que formen una doble hélice. Si uno de los extremos está constreñido, la separación de las dos hebras en el otro extremo provocará enrollamiento. **(b)** En una molécula de DNA, el avance de una DNA o RNA polimerasa (como la aquí mostrada) a lo largo del DNA implica la separación de las hebras. Como resultado, el DNA se sobre-enrolla por delante del enzima y se desenrolla por detrás. Las flechas rojas indican la dirección del enrollamiento.

con una vuelta de la doble hélice cada 10,5 pb, el DNA se encontrará relajado en lugar de superenrollado **(Fig. 24-12)**. El superenrollamiento se produce cuando el DNA está sometido a algún tipo de tensión estructural. El DNA circular cerrado purificado raramente se encuentra relajado, con independencia de su origen biológico. Además, los DNA procedentes de un determinado tipo celular tienden a poseer un grado de superenrollamiento característico. La estructura del DNA se encuentra, pues, sometida a una tensión, cuya magnitud está regulada por la célula con objeto de inducir el superenrollamiento.

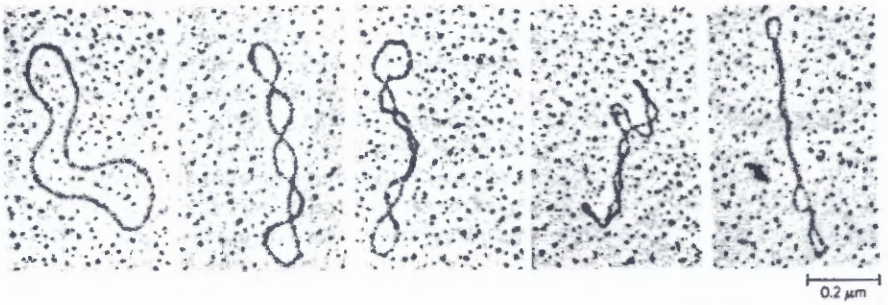


FIGURA 24-12 DNA plasmídicos relajados y superenrollados. La molécula más a la izquierda está relajada; el grado de superenrollamiento aumenta de izquierda a derecha. Fuente: Laurien Polder, de A.Kornberg, DNA *Replication*, p 29, W. H. Freeeman, New York, 1980.]

En general, la tensión es el resultado de un **subenrollamiento** de la doble hélice en el DNA circular cerrado. Dicho de otro modo, el DNA tiene *menos* vueltas de hélice de lo que sería de esperar para la estructura en forma B. Los efectos del subenrollamiento se ilustran en la **Figura 24-13**. Un segmento de 84 pb de un DNA circular relajado contiene ocho vueltas de la doble hélice, o sea, una vuelta cada 10,5 pb. Si se eliminase una vuelta, habría (84 pb)/7= 12,0 pb por vuelta en lugar de las 10,5 que se observan en el B-DNA (Fig.24-13b). Ello supondría una desviación respecto a la forma más estable del DNA, y como resultado la molécula sufriría una tensión termodinámica. Normalmente, la mayor parte de la tensión se absorbería por el enrollamiento del eje del DNA sobre sí mismo para formar una superhélice (Fig. 24-13c; una parte de la tensión en est4e segmento de 84 pb simplemente se dispersaría en el conjunto de la molécula de DNA mayor). En principio, la tensión también podría absorberse separando las dos hebras de DNA a lo largo de una distancia de unos 10 pb (Fig. 24-13d). En el DNA circular cerrado purificado, la tensión producida por el subenrollamiento se absorbe habitualmente por el superenrollamiento, no por la separación de las hebras, porque la espiralación del eje del DNA requiere menos energía que la rotura de los puentes de hidrógeno que estabilizan los pares de bases. Sin embargo, hay que señalar que el subenrollamiento del DNA in vivo facilita la separación de las hebras del DNA y, por tanto, facilita el acceso a la información que contienen.

COPY-STATION

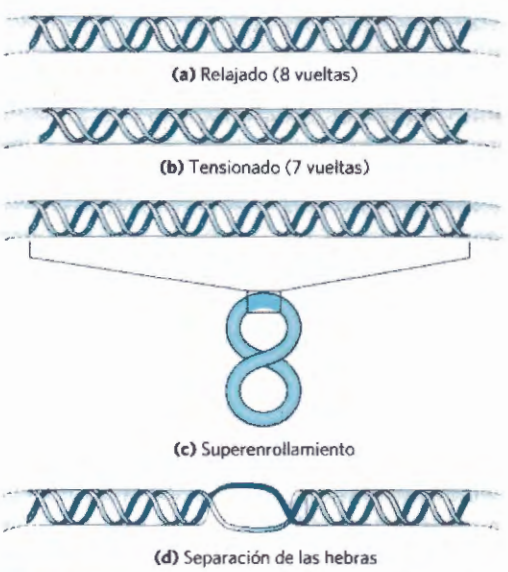


FIGURA 24-13 Efectos del desenrollamiento del DNA. **(a)** Segmento de una molécula de DNA circular cerrado de 84 pares de bases en su forma relajada con ocho vueltas de hélice. **(b)** La eliminación de una vuelta genera una tensión estructural. **(c)** La tensión es acomodada, en general, por el superenrollamiento. **(d)** El desenrollamiento del DNA también facilita la separación de las hebras. En principio, cada vuelta eliminada debería facilitar la separación de las hebras en una longitud de unos 10 pares de bases, tal como se indica. Sin embargo, los puentes de hidrógeno de los pares de bases impiden la separación de las hebras sobre distancias tan cortas y el efecto sólo resulta importante en DNA más largos y con niveles superiores de desenrollamiento.

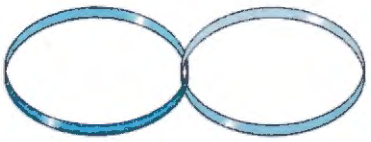
Todas las células subenrollan activamente su DNA con la ayuda de procesos enzimáticos (descritos más adelante), y el estado tensionado resultante constituye una forma de almacenamiento de energía. Las células mantienen el DNA en un estado subenrollado para facilitar su compactación por superenrollamiento. Además, el subenrollamiento del DNA es importante para los enzimas del metabolismo del DNA que deben facilitar la separación de las hebras como una parte de sus funciones.

El estado subenrollado únicamente puede mantenerse si el DNA es un círculo cerrado o si se encuentra unido y estabilizado por proteínas, de manera que las hebras no tengan libertad de rotación una en torno de la otra. Si se produce un corte en una de las cadenas de un DNA circular libre de proteínas, la libre rotación en este punto hará que el DNA subenrollado revierta de modo espontáneo al estado relajado. Sin embargo, en una molécula de DNA circular cerrado, el número de vueltas de la hélice es fijo y no puede cambiar sin al menos un corte transitorio en una de las hebras. Por tanto, el número de vueltas de la hélice de una molécula de DNA constituye una representación precisa del superenrollamiento.

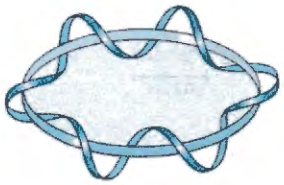
El subenrollamiento del DNA se define por el número de enlace topológico

Varias ideas que son de utilidad en esta discusión proceden de la rama de las matemáticas conocida como topología, en particular el concepto de **número de enlace**. El número de enlace es una propiedad topológica del DNA de doble cadena, pues no varía a consecuencia de la curvatura o la deformación del DNA, siempre que las dos cadenas permanezcan intactas. El concepto de número de enlace (*Lk*) se ilustra en la **Figura 24-14**.

Empecemos visualizando la separación de las dos cadenas de un DNA circular de doble cadena. Si las dos hebras están ligadas tal como se muestra en la Figura 24-14a, se encuentran efectivamente unidas por un



(a) $Lk = 1$



(b) $Lk = 6$

FIGURA 24-14 El número de enlace, *Lk*. Como de costumbre, cada cinta azul representa una hebra de una molécula de DNA de doble cadena. La molécula en **(a)** tiene un $Lk = 1$. La molécula en **(b)** tiene un $Lk = 6$. Con propósito ilustrativo, una de las hebras de **(b)** se representa sin torsión para definir así el borde de una superficie imaginaria (sombreada en azul). El número de veces que la hebra con torsión cruza esta superficie define con precisión el valor del número de enlace.

enlace que denominaremos topológico. Incluso si se eliminasen todos los enlaces de hidrógeno y las interacciones de apilamiento de las bases, de modo que las cadenas ya no estuviesen en contacto físico, este enlace topológico continuaría manteniendo las dos cadenas unidas. Podemos suponer que una de las dos hebras es el límite de una superficie imaginaria (como, por ejemplo, una película de jabón que ocupara todo el espacio limitado por un alambre circular antes de hinchar una pompa de jabón). El número de enlace puede definirse como el número de veces que la segunda hebra atraviesa esta superficie. Para la molécula de la Figura 24-14a, $Lk = 1$; para la molécula de la Figure 24-14b, $Lk = 6$. El número de enlace de un DNA circular cerrado es siempre un número entero. Por convención, si los enlaces entre las dos cadenas están dispuestos de tal forma que las dos hebras del DNA se hallen entrelazadas siguiendo una hélice dextrógira, el número de enlace se considera positivo (+). El número de enlace es negativo (-) para un entrelazamiento en hélice levógira. En la práctica, no encontraremos números de enlace negativos en el DNA.

Podemos ahora aplicar estas ideas a un DNA circular cerrado con 2.100 pb **(Fig. 24-15a)**. Para una molécula relajada, el número de enlace es simplemente el número de pares de bases dividido por el número de pares de bases por vuelta, es decir próximo a 10,5; por tanto, en este caso, $Lk = 200$. Para que una molécula de DNA circular posea una propiedad topológica tal como el número de enlace no ha de haber ningún corte en ninguna de las dos hebras. Si hubiera un corte en cualquiera de las dos hebras, en principio, sería posible desenrollar y separar las hebras completamente. En este caso no existe enlace topológico y *Lk* no está definido (Fig. 24-15b).

Ahora podemos describir el subenrollamiento del DNA en términos de los cambios del número de enlace. El número de enlace del DNA relajado, designado por Lk_0, se toma como referencia. En la molécula que se muestra en la Figura 24-15a, $Lk_0 = 200$; si eliminásemos dos vueltas en la molécula, Lk_0 sería igual a 198. Este cambio puede ser descrito por la ecuación:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 198 - 200 = -2 \qquad (24\text{-}1)$$

COPYSTATION

A menudo resulta conveniente expresar la variación del número de enlace en términos de una magnitud independiente de la longitud de la molécula de DNA. Esta magnitud, denominada **diferencia de enlace específica** o **densidad superhelicoidal (σ)**, es una medida del número de vueltas eliminadas con respecto a las presentes en el DNA relajado:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \qquad (24\text{-}2)$$

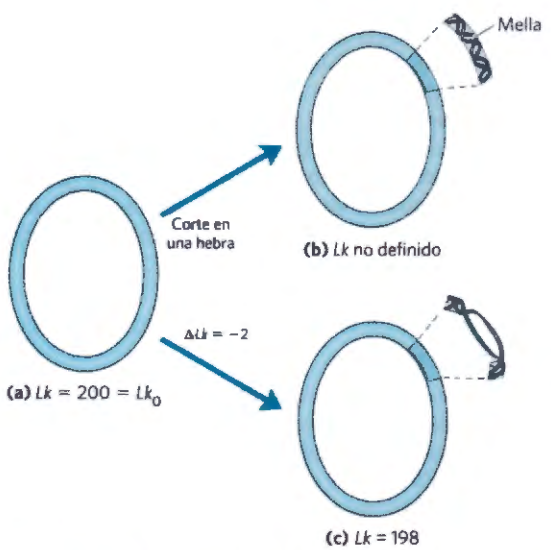


FIGURA 24-15 El número de enlace de las moléculas de DNA circular cerrado. Se presentan tres formas de un DNA circular de 2.100 pares de bases: **(a)** relajado, $Lk = 200$; **(b)** relajado con una mella (corte) en una de las cadenas, *Lk* no definido; **(c)** subenrollado con dos vueltas menos, $Lk = 198$. La molécula desenrollada generalmente se encuentra superespiralada, pero el desenrollamiento también facilita la separación de las hebras.

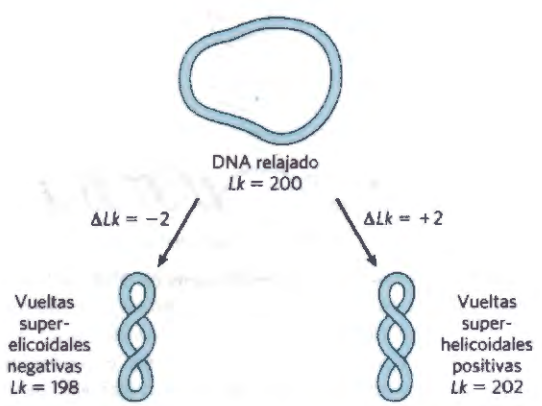


FIGURA 24-16 Superenrollamientos positivos y negativos. En la molécula relajada de la Figura 24-15a, un desenrollamiento o un sobrenrollamiento de dos vueltas helicoidales ($Lk = 198$ o 202) producirá un superenrollamiento negativo o positivo, respectivamente. Obsérvese que el eje del DNA se retuerce en direcciones opuestas en los dos casos.

En el ejemplo de la Figura 24-15c, σ = - 0,01, lo que significa que el 1% (2 de 200) de las vueltas de la hélice del DNA (en forma B) han sido eliminadas. El grado de subenrollamiento del DNA celular suele oscilar entre un 5% y un 7%; es decir, σ = -0,05 a -0,07. El signo negativo indica que la variación del número de enlace se debe al subenrollamiento del DNA. El superenrollamiento inducido por el subenrollamiento se define, por tanto, como superenrollamiento negativo. Por el contrario, en determinadas condiciones, el DNA puede estar sobre-enrollado, y entonces el superenrollamiento resultante se define como positivo. Obsérvese que la trayectoria descrita por el eje de la hélice cuando el DNA está subenrollado (superenrollamiento negativo) es la imagen especular de la descrita por el DNA sobrenrollado (superenrollamiento positivo) **(Fig. 24-16)**. El superenrollamiento no es un proceso al azar; el signo del superenrollamiento depende en gran medida de la tensión torsional aplicada al DNA que aumenta o disminuye el número de enlace en relación con el B-DNA relajado.

El número de enlace puede variar en ±1 mediante el corte de una de las hebras del DNA, la rotación de 360° de uno de los extremos alrededor de la hebra intacta y el empalme de los extremos cortados. Este proceso no tiene ningún efecto sobre el número de pares de bases ni sobre el número de átomos de la molécula de DNA circular. Dos formas de un DNA circular que difieran únicamente en una propiedad topológica como el número de enlace se conocen como **topoisómeros**.

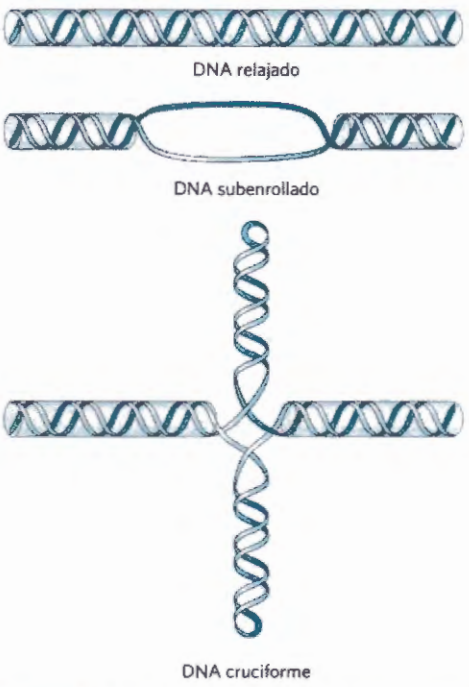


FIGURA 24-17 Modelo de cintas para ilustrar la torsión y el retorcimiento. La cinta ocre representa el eje de una molécula de DNA relajada. La tensión producida por la torsión de la cinta (subenrollamiento del DNA) puede manifestarse como un cambio en el retorcimiento o en la torsión. Los cambios topológicos del número de enlace suelen estar acompañados por cambios geométricos tanto en el retorcimiento como en la torsión.

COPY-STATION

EJEMPLO PRÁCTICO 24-1 Cálculo de la densidad superhelicoidal

¿Cuál es la densidad superhelicoidal (σ) de un DNA circular cerrado de 4.200 pb de longitud y un número de enlace (Lk) de 374? ¿Cuál es la densidad superhelicoidal del mismo DNA cuando Lk = 412? ¿Estas moléculas están negativamente o positivamente superenrolladas?

Solución: LPrimero se calcula Lk_0 dividiendo la longitud del DNA circular cerrado (en pb) por 10,5 pb/vuelta: (4.200 pb)/(10,5 pb/vuelta) = 400. Ahora se puede calcular ΔLk con la ecuación 24-1: $\Delta Lk = Lk - Lk_0$ = 374 - 400 = -26. Sustituyendo los valores de ΔLk y Lk_0 en la ecuación 24-2: $\sigma = \Delta Lk / Lk_0$ = -26/400 = -0,065. Puesto que la densidad superhelicoidal es negativa, esta molécula de DNA está superenrollada negativamente.

Cuando esta misma molécula de DNA tiene un Lk de 412, ΔLk = 412-400 = 12 y σ = 12/400 = 0,03. La densidad superhelicoidal es positiva y la molécula se encuentra superenrollada positivamente.

Además de causar el superenrollamiento y favorecer la separación de las hebras, el subenrollamiento del DNA facilita la aparición de cambios estructurales en la molécula. Estos tienen menor importancia fisiológica, pero ayudan a ilustrar los efectos del subenrollamiento. Recuerde que una estructura cruciforme (véase la Fig. 8-19) suele contener un pequeño número de bases desapareadas, y el subenrollamiento del DNA permite mantener la necesaria separación de las hebras **(Fig. 24-17)**. Además, el subenrollamiento de una hélice dextrógira facilita la formación de cortas regiones de Z-DNA levógiro, allí donde la secuencia de bases lo permite (véase el Capítulo 8).

Las topoisomerasas catalizan cambios en el número de enlace del DNA

El superenrollamiento del DNA es un proceso regulado de forma precisa que tiene influencia sobre muchos aspectos del metabolismo del DNA. Todas las células tienen enzimas cuya única misión es desenrollar y/o relajar el DNA. Los enzimas que aumentan o disminuyen el grado de subenrollamiento del DNA se denominan **topoisomerasas**, y su efecto es la modificación del número de enlace. Estos enzimas juegan un papel especialmente importante en procesos tales como la replicación y el empaquetamiento del DNA. Hay dos clases de topoisomerasas. Las **topoisomerasas de tipo I** realizan un corte transitorio en una de las dos hebras del DNA, hacen pasar la hebra intacta a través del corte y vuelven a unir los extremos cortados; cambian Lk en incrementos de 1. Las **topoisomerasas de tipo II** cortan ambas hebras y hacen variar Lk en incrementos de 2.

Los efectos producidos por estos enzimas pueden estudiarse mediante electroforesis en gel de agarosa **(Fig. 24-18)**. Una población de DNA plasmídicos idénticos con el mismo número de enlace migran como una banda discreta durante la electroforesis. Esta técnica permite separar topoisómeros cuyos valores de Lk difieran en una sola unidad. De este modo, es fácil observar

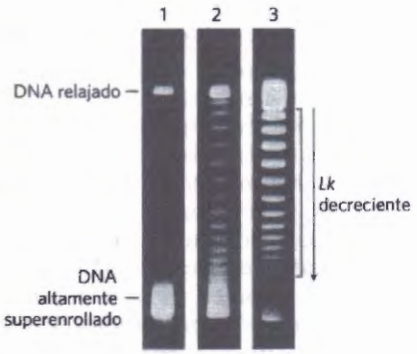


FIGURA 24-18 Visualización de los topoisómeros. En este experimento, todas las moléculas de DNA tienen el mismo número de pares de bases, pero diferente grado de superenrollamiento. Las moléculas de DNA superenrollado son más compactas que las moléculas relajadas y, por tanto, migran más rápidamente en electroforesis en gel. Los geles que aquí se muestran separan los topoisómeros (que se mueven de arriba abajo) dentro de un estrecho margen de valores de densidad superhelicoidal. En el carril 1, el DNA altamente superenrollado migra como una banda única, a pesar de que probablemente estén presentes varios topoisómeros diferentes. En los carriles 2 y 3 se ilustra el efecto del tratamiento del DNA superenrollado con una topoisomerasa de tipo I; el DNA del carril 3 se trató durante más tiempo que el del carril 2. A medida que la densidad superhelicoidal del DNA disminuye van apareciendo bandas distintas, que caen dentro del intervalo en el que el gel puede resolver topoisómeros individuales. Cada una de las bandas de la región indicada por el corchete al lado del carril 3 contiene círculos de DNA con el mismo número de enlace; el número de enlace cambia en una unidad de una banda a la siguiente. [Fuente: Cortesía del Laboratorio de Michael Cox.]

los cambios en el número de enlace inducidos por las topoisomerasas.

E. coli tiene al menos cuatro topoisomerasas distintas (de la I a la IV). Las de tipo I (topoisomerasas I y III) suelen relajar el DNA eliminando superenrollamientos negativos (aumentan *Lk*). La forma con la que las topoisomerasas de tipo I bacterianas cambian el número de enlace se ilustra en la **Figura 24-19**. Un enzima bacteriano de tipo II, denominado topoisomerasa II o, alternativamente, DNA girasa, puede introducir superenrollamientos negativos (disminuye *Lk*). Para ello este enzima utiliza la energía del ATP. Para alterar el número de enlace del DNA las topoisomerasas de tipo II cortan ambas hebras de la molécula de DNA y pasan otro dúplex a través del corte. La densidad superhelicoidal del DNA bacteriano se mantiene mediante la regulación de las actividades netas de las topoisomerasas I y II.

Las células eucarióticas también poseen topoisomerasas de los tipos I y II. Las topoisomerasas I y III son ambas de tipo I. El único enzima de tipo II tiene dos isoformas en los vertebrados, denominadas IIα y IIβ. La mayoría de enzimas de tipo II, incluida una DNA girasa de las arqueas, están relacionadas y constituyen una familia denominada tipo IIA. Las arqueas tienen un enzima inusual, la topoisomerasa VI, que por sí sola define la familia del tipo IIB. Las topoisomerasas eucarióticas de tipo II no subenrollan el DNA (inducción de superenrollamiento negativo), pero son capaces de relajar tanto supe-

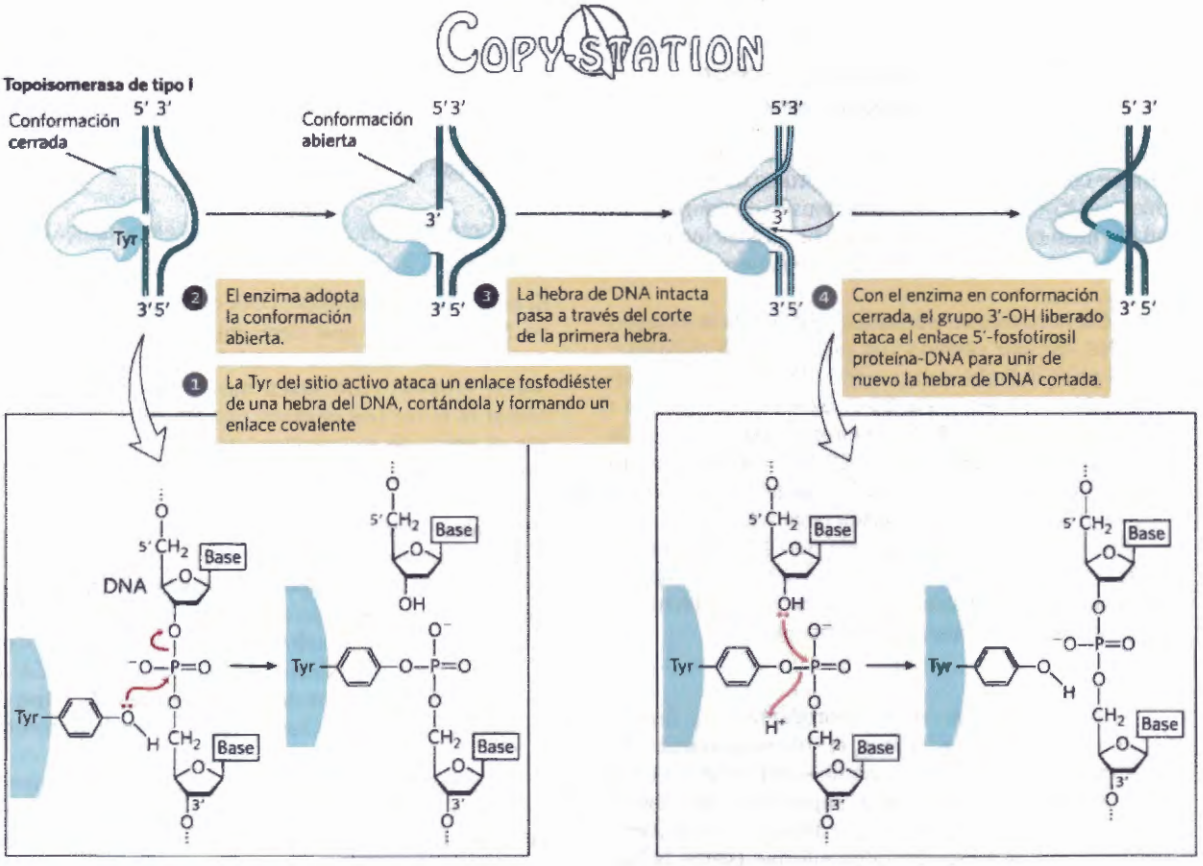


FIGURA DE MECANISMO 24-19 Reacción de la topoisomerasa tipo I. La topoisomerasa I bacteriana aumenta el *Lk* cortando una de las hebras del DNA, pasando la hebra intacta a través del corte y finalmente sellando el corte. El ataque nucleofílico por la Tyr del sitio activo corta una de las hebras del DNA. Los extremos se ligan por un segundo ataque nucleofílico. A cada paso, un enlace de alta energía reemplaza a otro. [Fuente: Información de J.J. Champoux, *Ann. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 3]

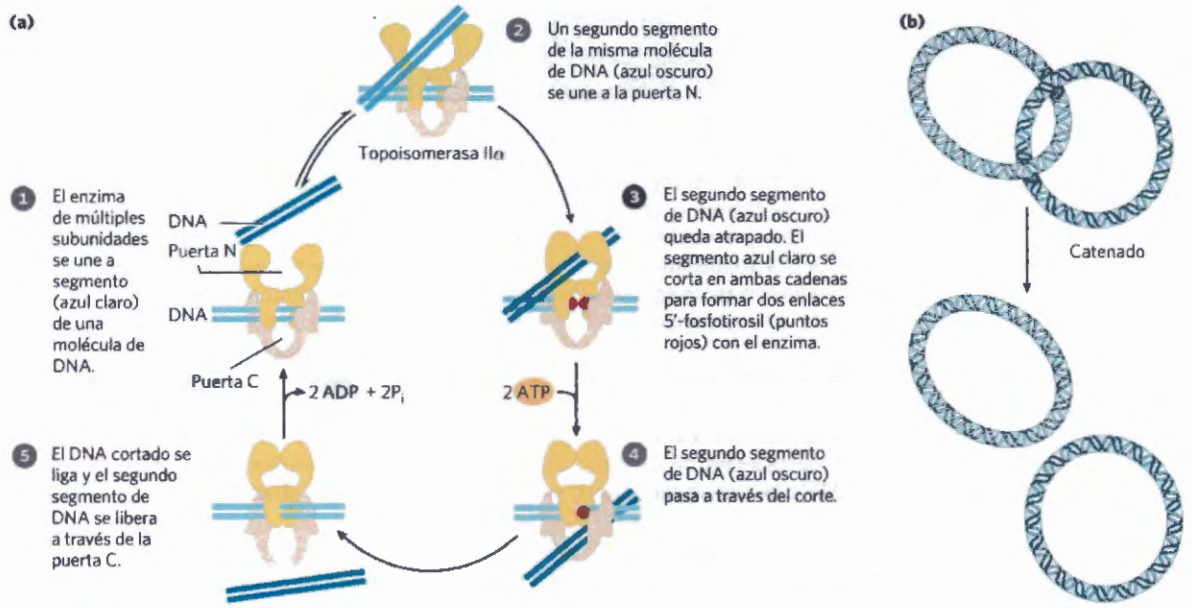


FIGURA 24-20 Alteración del número de enlace por una topoisomerasa eucariótica de tipo IIα. El mecanismo general consiste en el paso de un segmento intacto de DNA dúplex a través de un corte transitorio en otro segmento de cadena doble. El segmento de DNA entra y abandona la topoisomerasa a través de cavidades con puertas por encima y por debajo del DNA unido, que se denominan puerta N y puerta C. Se hidrolizan dos ATP durante este ciclo. La estructura del enzima y el uso de ATP son específicos de esta reacción. [Fuente: Información de J.J. Champoux, *Ann. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 11]

renrollamientos positivos como negativos **(Fig. 24-20a)**. La capacidad de las topoisomerasas de tipo II de pasar un segmento de DNA dúplex a través de un corte de cadena doble de otro dúplex permite que estos enzimas resuelvan **catenados**, círculos de DNA topológicamente ligados (Fig. 24-20b). Algunas topoisomerasas están especializadas en la descatenación. Por ejemplo, las bacterias poseen un enzima del tipo II, denominada topoisomerasa IV, que esta implicada en desanudar los cromosomas durante la división celular (Capítulo 25).

Las arquea poseen un enzima poco usual, la topoisomerasa VI, que define por sí sola la familia tipo IIB. La diversidad de las topoisomerasas se muestra en la Tabla 24-4.

En los próximos capítulos mostraremos cómo las topoisomerasas juegan un papel crítico en todos los aspectos del metabolismo del DNA. Son, pues, importantes dianas farmacológicas en el tratamiento de infecciones bacterianas y en el cáncer (Recuadro 24-1)

TABLA 24-4 Diversidad en el DNA de las topoisomerasas

Tipo	Mecanismo	Familia	Dominio(s)	Notas
IA	Paso de la Hebra	Topoisomerasa I	Bacterias, eucariotas	Relaja (–)
		Topoisomerasa III	Bacterias, eucariotas	Relaja (–)
		Girasa reversa	Arqueas, bacterias	Usa ATP para introducir vueltas superhelicoidales positivas; solamente bacterias termófilas y arqueas
IB	Suivelasa	Topoisomerasa IB	Bacterias, eucariotas	Unas pocas bacterias; todos los eucariotas
IC	Suivelasa	Topoisomerasa V	Arqueas	*Methanopyrus* only
IIA	Paso de la Hebra	Topoisomerasa II (DNA girasa)	Arqueas, bacteria	Introduce vueltas superhelicoidales neagativas (ATPase)
		Topoisomerasa IIα	Eucariotas	Relaja (+ o –)
		Topoisomerasa IIβ	Eucariotas	Relaja (+ o –)
		Topoisomerasa IV	Bacteria	Decatenasa
IIB	Paso de la Hebra	Topoisomerasa VI	Arqueas, bacteria, eucariotas	Sólo plantas, algas y protistas

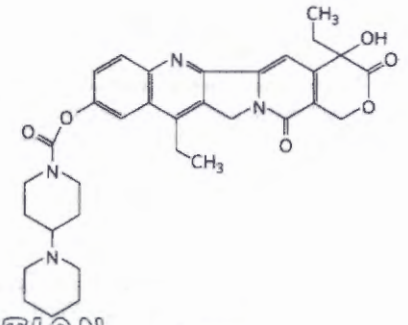
RECUADRO 24-1 MEDICINA Curación de enfermedades mediante la inhibición de topoisomerasas

El estado topológico del DNA celular se encuentra íntimamente conectado con su función. Sin topoisomerasas, las células no pueden replicarse o empaquetar su DNA o expresar sus genes y, en consecuencia, mueren. Los inhibidores de las topoisomerasas se han convertido, por tanto, en importantes agentes farmacológicos para combatir agentes infecciosos o células malignas.

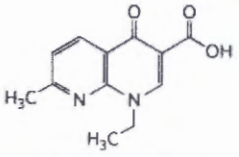
Se han desarrollado dos clases de inhibidores de las topoisomerasas bacterianas que actúan como antibióticos. Las cumarinas, novobiocina y cumermicina A1, son productos naturales derivados de especies de *Streptomyces*. Inhiben la unión del ATP a las topoisomerasas bacterianas de tipo II, DNA girasa y topoisomerasa IV. Estos antibióticos no se usan con frecuencia para tratar infecciones en humanos, pero la investigación continúa para identificar variantes clínicamente útiles.

Los antibióticos derivados de la quinolona, también inhibidores de la DNA girasa y la topoisomerasa IV bacrerianas, hicieron su aparición en 1962 con el ácido nalidíxico. Este compuesto mostró una efectividad limitada y ya no se usa en clínica en Estados Unidos, pero el desarrollo continuado de esta clase de fármacos finalmente desembocó en la introducción de las fluoroquinolonas, por ejemplo, el ciprofloxacino (Cipro). Las quinolonas actúan bloqueando el último paso de la reacción de la topoisomerasa, la reparación de los cortes del DNA. El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro. Es uno de los pocos antibióticos efectivos en el tratamiento de las infecciones por ántrax, y se considera un agente eficaz en la protección contra el posible bioterrorismo. Las quinolonas son selectivas para las topoisomerasas bacterianas, pues inhiben los enzimas eucarióticos sólo a concentraciones varios órdenes de magnitud mayores que las dosis terapeúticas.

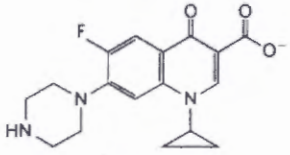
Alguno de los agentes más importantes en la quimioterapia del cáncer son inhibidores de las topoisomerasas humanas. Las topoisomerasas están presentes generalmente en niveles elevados en las células tumorales y los agentes dirigidos contra estos enzimas



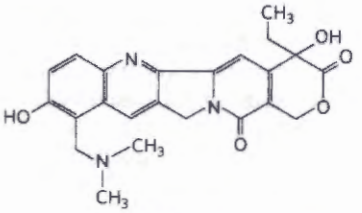
Irinotecano



Acido nalixídico



Ciprofloxacino



Topotecano

COPY-STATION

La compactación del DNA requiere una forma especial de superenrollamiento

Las moléculas de DNA superenrollado son uniformes en varios aspectos. En una molécula de DNA superenrollado negativamente (Fig. 24-16) las vueltas superhelicoidales son hacia la derecha. El DNA superenrollado tiende a adoptar una forma extendida y estrecha en lugar de compacta, y suele presentar ramificaciones múltiples **(Fig. 24-21)**. Con los valores de densidad superhelicoidal normalmente presentes en la célula, la longitud del eje de la superhélice, ramificaciones incluídas, es un 40% de la longitud del DNA. Este tipo de superenrollamiento se denomina **plectonémico** (del griego *plektos*, "retorcido", y *nema* "hebra"). Este término puede ser aplicado a cualquier estructura cuyas hebras estén entrelazadas de forma simple y regular y describe correctamente la estructura general del DNA superenrollado en disolución.

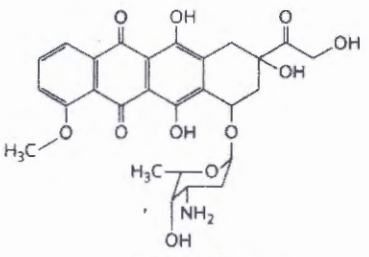
El superenrollamiento plectonémico, la forma observada en los DNA aislados en el laboratorio, no proporciona la compactación necesaria para empaquetar el DNA en la célula. Un DNA subenrollado puede adoptar una segunda forma de superenrollamiento, denominada **solenoidal (Fig. 24-22)**. A diferencia de los superenrollamientos extendidos y hacia la derecha característicos de la forma plectonémica, el superenrollamiento solenoidal incorpora vueltas compactas hacia la izquierda. La estructura resultante es similar a la adoptada por una manguera de jardín enrollada cuidadosamente alrededor de un soporte cilíndrico. Aunque sus estructuras son muy diferentes, los superenrollamientos plectonémico y solenoidal representan dos formas de superenrollamiento negativo que puede adoptar el *mismo* segmento de DNA desenrollado. Las dos formas pueden interconvertirse con facilidad. La forma plectonémica es más estable en disolución, pero la forma solenoidal puede estabilizarse mediante la unión de proteínas, y es

son mucho más tóxicos para los tumores que para la mayor parte de otros tejidos. Se han desarrollado inhibidores tanto de las topoisomerasas de tipo I como de las de tipo II como fármacos anticancerígenos.

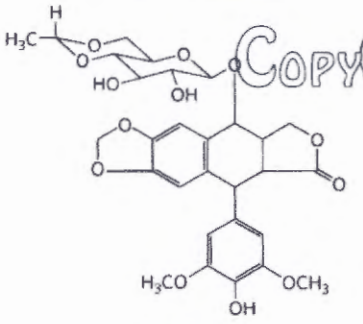
La camtoptecina, aislada de un árbol ornamental de origen chino, se sometió a pruebas clínicas por primera vez en la década de 1970 como inhibidor de las topoisomerasas eucariotas de tipo I. Las pruebas clínicas mostraron una eficacia limitada, a pesar de sus efectos prometedores iniciales en ratones. No obstante, en la década de 1990 se desarrollaron dos derivados, irinotecano (Campto) y topotecano (Hycamtin), efectivos en el tratamiento del cáncer colorrectal y de ovarios, respectivamente. Otros derivados probablemente sean aprobados para uso clínico en los próximos años. Todos estos fármacos actúan atrapando el complejo DNA-topoisomerasa en el que se corta el DNA inhibiendo su religación.

Las topoisomerasas humanas de tipo II son dianas de diversos fármacos antitumorales, entre los que se encuentran la doxorrubicina (Adriamycin), el etopósido (Etopophos) y la elipticina. La doxorrubicina, efectiva contra varios tipos de tumores humanos, es una antraciclina de uso clínico. La mayoría de estos fármacos estabilizan el complejo covalente topoisomerasa-DNA(cortado).

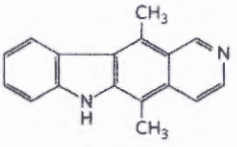
Todos estos agentes anticancerosos generalmente aumentan las lesiones en el DNA de las células diana tumorales en rápido crecimiento. Sin embargo, los tejidos no cancerosos también pueden verse afectados, apareciendo una toxicidad general y efectos secundarios desagradables que deben ser tratados adecuadamente durante la terapia. A medida que las terapias contra el cáncer se hacen más efectivas y las estadísticas de supervivencia de los pacientes de cáncer mejoran, la aparición independiente de nuevos tumores se está convirtiendo en un grave problema. En la búsqueda constante de nuevas terapias contra el cáncer, las topoisomerasas probablemente sigan siendo un importante objetivo de investigación.



Doxorrubicina



Etopósido



Elipticina

COPY-STATION

la forma que se encuentra en los cromosomas eucarióticos. Da lugar a un grado de compactación mucho mayor (Fig. 24-22). El superenrollamiento solenoidal es el mecanismo mediante el cual el subenrollamiento contribuye a la compactación del DNA en las células.

RESUMEN 24.2 El DNA superenrollado

■ La mayor parte del DNA celular está superenrollado. El subenrollamiento disminuye el número total de vueltas helicoidales del DNA en relación con la forma B

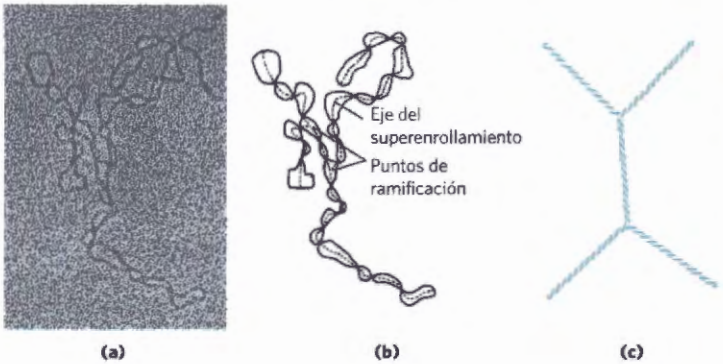


FIGURA 24-21 Superenrollamiento plectonémico. (a) Micrografía electrónica de un DNA de plásmido superenrollado plectonémicamente, junto con una interpretación de la estructura observada (b). Las líneas de color púrpura muestran el eje del superenrollamiento. Obsérvese la ramificación de la superhélice. (c) Representación idealizada de esta estructura. [Fuente: vuelto a publicar con permiso de Elsevier, de T.C. Boles et al. (1990) "Structure of plectonemically supercoiled" *J. Mol. Biol.* 213: 931-951, Fig.2, permiso gestionado por Copyright Clearance Center, Inc.]

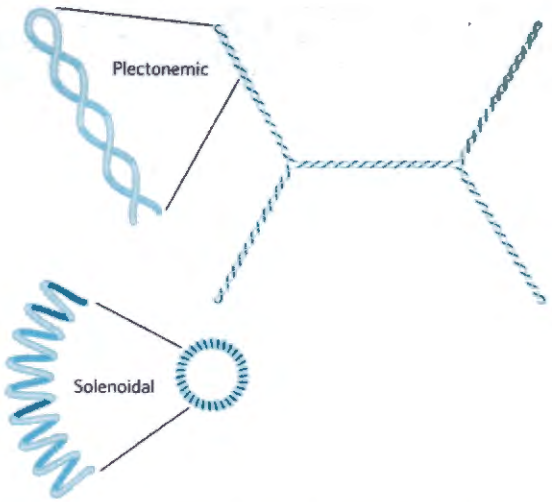


FIGURA 24-22 Superenrollamientos plectonémico y solenoidal de la misma molécula de DNA, dibujados a escala. El superenrollamiento plectonémico adopta la forma de una trenza dextrógira extendida. El superenrollamiento solenoidal negativo consiste en vueltas apretadas hacia la izquierda alrededor de una estructura tubular imaginaria. Las dos formas pueden interconvertirse con facilidad, aunque la forma solenoidal no se observa normalmente a menos que ciertas proteínas se unan al DNA. El superenrollamiento solenoidal produce un grado de compactación mucho mayor.

relajada. Para mantener el estado subenrollado el DNA debe encontrarse en forma de círculo cerrado o bien unido a proteínas. El subenrollamiento se cuantifica mediante un parámetro topológico denominado número de enlace, Lk.

- El subenrollamiento se mide en términos de la diferencia de enlace específica, σ, (también denominada densidad superhelicoidal), y es igual a $(Lk\text{-}Lk_0)/Lk_0$. Para los DNA celulares σ varía entre -0,05 y -0,07, lo que significa que aproximadamente entre el 5% y el 7% de las vueltas del DNA han sido eliminadas. El subenrollamiento del DNA facilita la separación de las hebras por los enzimas del metabolismo del DNA.
- Los DNA que difieren solamente en número de enlace se denominan topoisómeros. Los enzimas que subenrollan y/o relajan el DNA, las topoisomerasas, catalizan cambios de número de enlace. Las dos clases de topoisomerasas, tipo I y tipo II, cambian Lk en incrementos de 1 o de 2, respectivamente, por evento catalítico.

24.3 La estructura de los cromosomas

El término "cromosoma" se usa para designar la molécula de ácido nucleico que actúa como depositaria de la información genética en un virus, una bacteria, una célula eucariótica o un orgánulo. También se refiere a los cuerpos densamente coloreados que pueden observarse con el microscopio óptico en los núcleos de las células eucarióticas teñidas con colorantes.

La cromatina está compuesta de DNA y proteínas

Durante el ciclo celular eucariótico (véase la Fig. 12-44) se producen grandes cambios en la estructura de los cromosomas **(Fig. 24-23)**. En las células eucarióticas

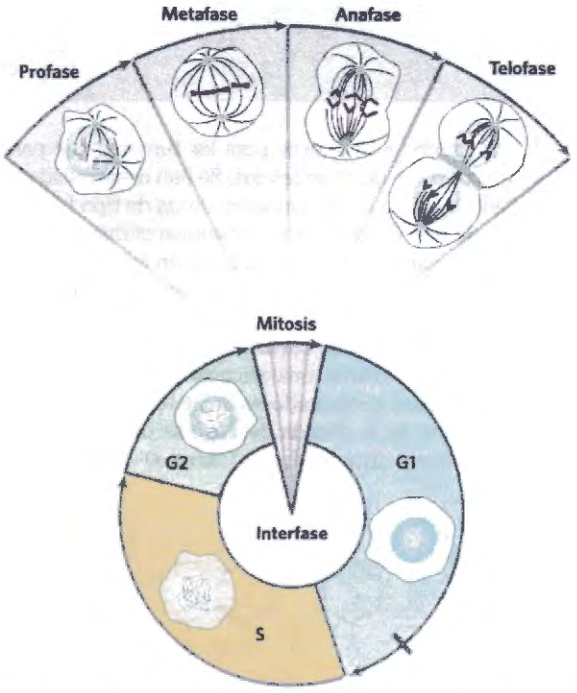


FIGURA 24-23 Cambios en la estructura de los cromosomas durante el ciclo celular eucariótico. Las longitudes relativas de las fases aquí mostradas son convencionales. La duración de cada fase varía con el tipo celular y las condiciones de crecimiento (para organismos unicelulares) o el estado metabólico (para organismos pluricelulares); la mitosis es normalmente la más corta. El DNA celular está descondensado durante la interfase, como se muestra en la representación del núcleo del diagrama. El periodo de la interfase puede subdividirse (véase la Fig. 12-44) en fase G1 (gap, hueco), fase S (síntesis), en la que se replica el DNA; y fase G2, en la que las parejas de cromosomas (cromátidas) replicados se cohesionan. El DNA se condensa durante la profase de la mitosis. Durante la metafase, los cromosomas condensados se disponen por pares en el plano equidistante de los polos del huso. Los dos cromosomas de cada pareja están unidos a diferentes polos del huso mediante microtúbulos que se extienden entre el huso y el centrómero. Las cromátidas hermanas se separan en la anafase, arrastrada cada una hacia el polo del huso al cual está conectada. El proceso se completa en la telofase. Una vez completada la división celular los cromosomas se descondensan y el ciclo comienza de nuevo.

que no se dividen (en la fase G0) o en interfase (G1, S y G2), el material cromosómico, denominado **cromatina**, es amorfo y aparenta encontrarse disperso al azar en diversas regiones del núcleo. Durante la fase S de la interfase, el DNA en este estado amorfo se replica, y cada cromosoma origina dos cromosomas hermanos (denominados cromátidas hermanas) que permanecen asociadas entre sí después de finalizada la replicación. Los cromosomas se condensan considerablemente durante la profase de la mitiosis y adquieren la forma definida de los pares de cromátidas hermanas características de cada especie (Fig. 24-5).

La cromatina está formada por fibras que contienen proteínas y DNA en cantidades aproximadamente iguales (en masa) y una pequeña cantidad de RNA. El DNA de la cromatina se encuentra íntimamente asociado con proteínas denominadas **histonas**, que empaquetan y ordenan el DNA en unidades estructurales denominadas **nucleosomas (Fig. 24-24)**. La cromatina también

Copy-Station

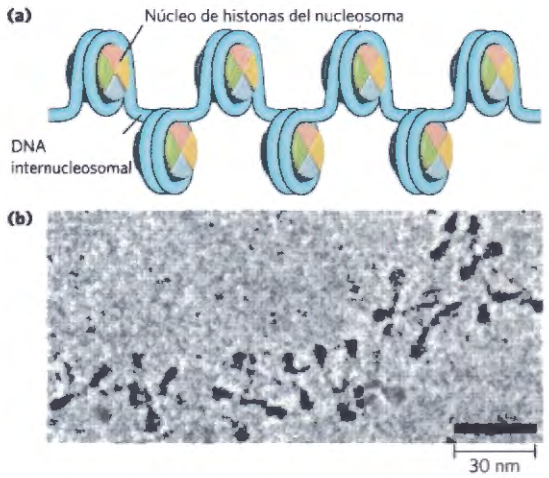


FIGURA 24-24 Nucleosomas. (a) Los nucleosomas espaciados de forma regular consisten en complejos de histonas unidos al DNA. **(b)** en esta micrografía electrónica las estructuras formadas por el DNA enrollado sobre el octámero de histonas son claramente visibles. [Fuente: **(b)** J. Bednar et al. Nucleosomes, linker DNA and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 95 no. 24: 14173-14178, november 1998 Cell Biology Fig. 1 c National Academy of Sciences, USA]

contiene muchas proteínas no histonas, algunas de las cuales ayudan a mantener la estructura del cromosoma mientras que otras regulan la expresión de genes específicos (Capítulo 28). El primer nivel de empaquetamiento del DNA eucariótico es el nucleosoma, a continuación el DNA se organiza en una sucesión de estructuras de orden superior que culminan en el cromosoma compacto visible al microscopio óptico. Ahora nos ocuparemos de esta estructura en los eucariotas y la compararemos con el empaquetamiento del DNA en las células bacterianas.

Las histonas son pequeñas proteínas básicas

Las histonas, presentes en la cromatina de todas las células eucarióticas, tienen masas moleculares relativas que van de 11.000 a 21.000 y son muy ricas en los aminoácidos básicos arginina y lisina (que juntos suponen aproximadamente una cuarta parte de los residuos aminoácidos). Todas las células eucarióticas tienen cinco clases principales de histonas, que difieren entre sí en masa molecular y composición de aminoácidos (Tabla 24-4). Las histonas H3 tienen una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica en todos los eucariotas, al igual que las histonas H4, lo que sugiere que sus funciones se han conservado rigurosamente. Por ejemplo, sólo 2 de los 102 residuos aminoácidos difieren entre las moléculas de la histona H4 de guisante y la de vaca y sólo 8 difieren entre la histona H4 de humanos y la de levadura. Las histonas H1, H2A y H2B presentan un menor grado de similitud entre especies eucarióticas.

Cada uno de estos tipos de histona es objeto de modificaciones enzimáticas por metilación, acetilación, ADP-ribosilación, fosforilación, glucosilación, sumoilación o ubiquitinación. Estas modificaciones afectan la carga eléctrica neta, la forma y otras propiedades de las histonas, así como las propiedades estructurales y funcionales de la cromatina y juegan un papel en la regulación de la transcripción.

Además, los eucariotas generalmente poseen varias variantes de ciertas histonas, principalmente de las histonas H2A y H3, descritas con más detalle más adelante. Las formas variantes, junto con sus modificaciones, tienen funciones especializadas en el metaholismo del DNA.

TABLA 24-5 Tipos y propiedades de las histonas comunes

Histonas	Masa molecular	Número de residuos aminoácidos	Contenido en aminoácidos básicos (% del total)	
			Lys	Arg
H1[a]	21.130	223	29,5	11,3
H2A[a]	13.960	129	10,9	19,3
H2B[a]	13.774	125	16,0	16,4
H3	15.273	135	19,6	13,3
H4	11.236	102	10,8	13,7

*El tamaño de estas histonas varía ligeramente según la especie. Estos datos corresponden a las histonas bovinas.

Los nucleosomas son las unidades fundamentales de organización de la cromatina

El cromosoma eucariótico mostrado en la Figura 24-5 representa la compactación de una molécula de DNA de una longitud de unos 10^5 μm en el interior de un núcleo celular que tiene un diámetro de entre 5 y 10 μm. Esta compactación es el resultado de la superposición de varios niveles de plegamiento altamente organizado. Si se someten los cromosomas a tratamientos de descondensación parcial, se pueden poner de manifiesto estructuras en las cuales el DNA se encuentra íntimamente unido a agregados proteicos, que a menudo se hallan espaciados regularmente. Las "cuentas" de esta formación en "rosario" son complejos de histonas y DNA. Las cuentas junto con el DNA de conexión entre las cuentas forman el nucleosoma, la unidad fundamental de organización de la cromatina, a partir de la cual se organiza el empaquetamiento de orden superior **(Fig. 24-25)**. Cada nucleosoma contiene ocho moléculas de histona, dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El espaciado de los nucleosomas a lo largo del DNA define una unidad repetitiva de unos 200 pb, de los que 146 pb están fuertemente unidos alrededor del núcleo de histonas y el resto sirve de DNA de unión entre los nucleosomas. La histona H1 está unida al DNA de conexión. Un tratamiento breve de la cromatina con enzimas que digieren el DNA, degrada preferentemente el DNA de conexión, liberándose partículas que contienen 146 pb de DNA, que se halla protegido de la digestión. Los nucleosomas así obtenidos se han cristalizado y la difracción de rayos X ha mostrado que el nucleosoma está formado por ocho moléculas de histona, sobre las cuales está enrollado el DNA, en forma de solenoide levógiro (Fig. 24-25). Las colas de las histonas se extienden hacia el exterior de los nucleosomas y están intrínsicamente desordenadas (Fig.

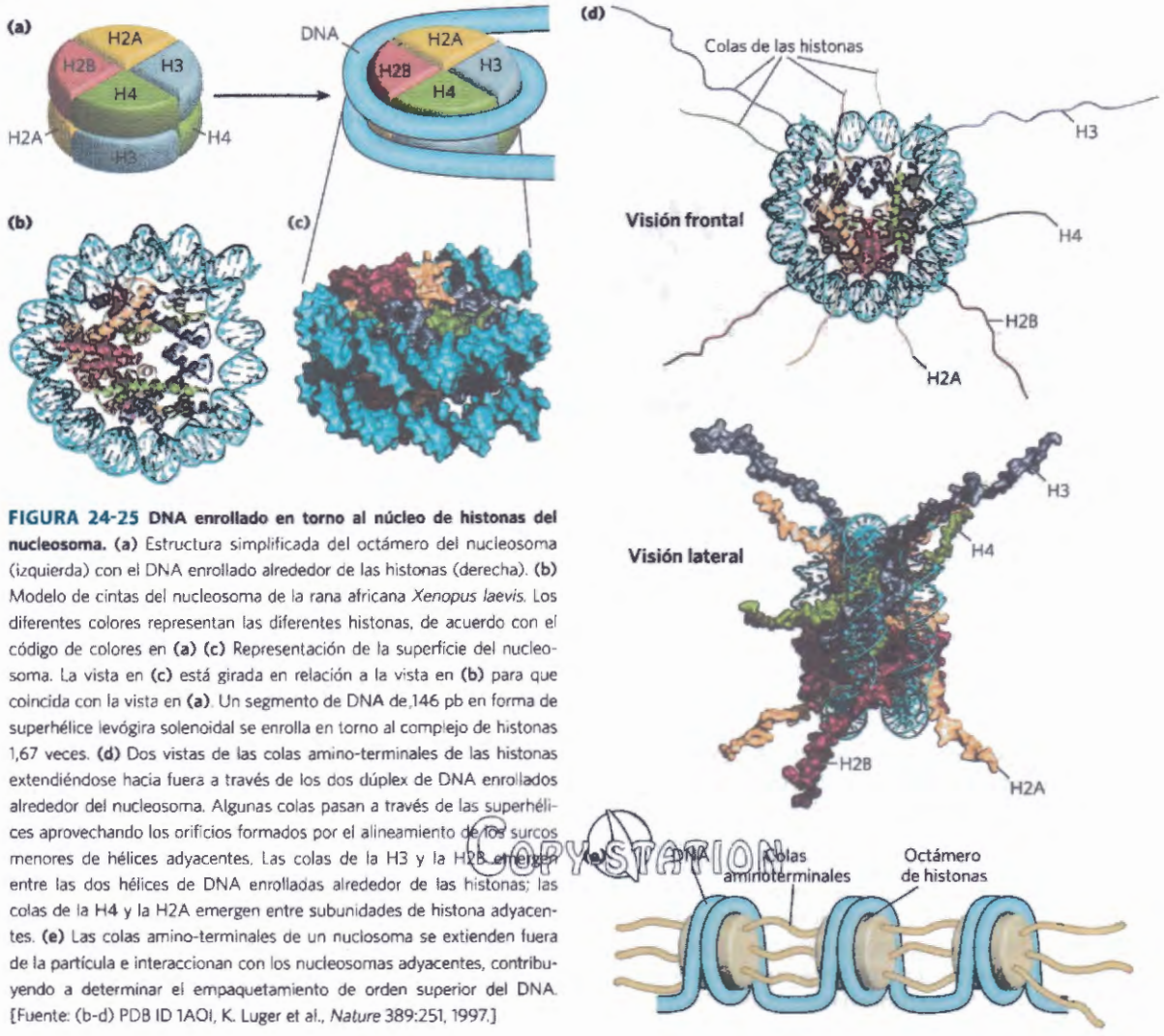


FIGURA 24-25 DNA enrollado en torno al núcleo de histonas del nucleosoma. **(a)** Estructura simplificada del octámero del nucleosoma (izquierda) con el DNA enrollado alrededor de las histonas (derecha). **(b)** Modelo de cintas del nucleosoma de la rana africana *Xenopus laevis*. Los diferentes colores representan las diferentes histonas, de acuerdo con el código de colores en **(a)** **(c)** Representación de la superficie del nucleosoma. La vista en **(c)** está girada en relación a la vista en **(b)** para que coincida con la vista en **(a)**. Un segmento de DNA de 146 pb en forma de superhélice levógira solenoidal se enrolla en torno al complejo de histonas 1,67 veces. **(d)** Dos vistas de las colas amino-terminales de las histonas extendiéndose hacia fuera a través de los dos dúplex de DNA enrollados alrededor del nucleosoma. Algunas colas pasan a través de las superhélices aprovechando los orificios formados por el alineamiento de los surcos menores de hélices adyacentes. Las colas de la H3 y la H2B emergen entre las dos hélices de DNA enrolladas alrededor de las histonas; las colas de la H4 y la H2A emergen entre subunidades de histona adyacentes. **(e)** Las colas amino-terminales de un nucleosoma se extienden fuera de la partícula e interaccionan con los nucleosomas adyacentes, contribuyendo a determinar el empaquetamiento de orden superior del DNA. [Fuente: (b-d) PDB ID 1AOI, K. Luger et al., *Nature* 389:251, 1997.]

COPYSTATION

24-25d). La mayoría de las modificaciones de las histonas ocurren en estas colas. A su vez, las colas juegan un papel determinante en el establecimiento de los contactos entre los nucleosomas en la cromatina (Fig. 24-25e).

El examen minucioso de esta estructura permite explicar por qué el DNA eucariótico se encuentra subenrollado a pesar de que las células eucarióticas carezcan de enzimas para subenrollar el DNA. Recuérdese que el enrollamiento solenoidal del DNA en los nucleosomas es una de las formas que puede adoptar el DNA subenrollado (superenrollado negativamente). El enrollamiento compacto del DNA alrededor de los núcleos de histona en las partículas nucleosomales requiere la eliminación de aproximadamente una vuelta de hélice en el DNA. Cuando el núcleo proteico de un nucleosoma se une in vitro a un DNA circular cerrado relajado, la unión introduce un superenrollamiento negativo. Puesto que esta unión no rompe el DNA ni varía el número de enlace, la formación de un superenrollamiento solenoidal negativo debe estar compensada por un superenrollamiento positivo del DNA que no se encuentra unido a proteína **(Fig. 24-26)**. Como se ha mencionado anteriormente, las topoisomerasas eucarióticas pueden relajar superenrollamientos positivos. La relajación del superenrollamiento positivo hace que el superenrollamiento negativo quede fijado (en virtud de la unión del DNA al núcleo de histonas del nucleosoma), y produce un descenso neto del número de enlace. Es, pues, natural que en ensayos in vitro las topoisomerasas resulten necesarias para estructurar la cromatina a partir de histonas purificadas y DNA circular cerrado.

Otro factor que afecta la unión del DNA a las histonas en los nucleosomas es la secuencia del DNA. Los núcleos de histonas no se unen al azar al DNA, sino que tienden a situarse en ciertas posiciones. No se conoce con seguridad la causa del posicionamiento, pero en algunos casos parece depender de la abundancia local de pares de bases A=T en los lugares de contacto de la hélice del DNA con las histonas **(Fig. 24-27)**. El íntimo enrollamiento del DNA alrededor del núcleo de histonas de los nucleosomas requiere la compresión del surco menor en estos puntos, que se ve facilitada por el agrupamiento de dos o tres pares de bases A=T. Los nucleosomas se unen particularmente bien donde los dinucleótidos AA, AT o TT están separados por intervalos de 10 pb. Esta disposición puede explicar hasta el 50% de las posiciones de las histonas unidas in vivo.

Los núcleos nucleosomales se depositan sobre el DNA durante la replicación o durante otros procesos que requieren el desplazamiento transitorio de nucleo-

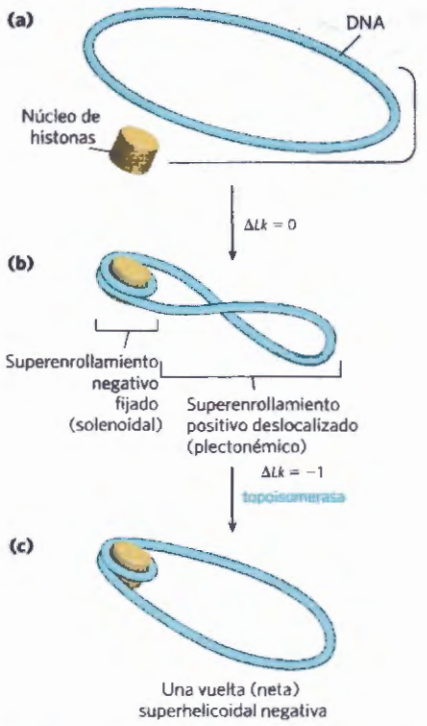


FIGURA 24-26 Ensamblado de la cromatina. **(a)** DNA circular cerrado relajado. **(b)** La unión de un núcleo de histonas para formar un nucleosoma induce una vuelta superehelicoidal negativa. En ausencia de cortes en las cadenas, tiene que formarse una vuelta superhelicoidal positiva en algún otro lugar del DNA ($\Delta Lk = 0$). **(c)** La relajación del superenrollamiento positivo por una topoisomerasa deja una vuelta superhelicoidal negativa neta ($\Delta Lk = -1$).

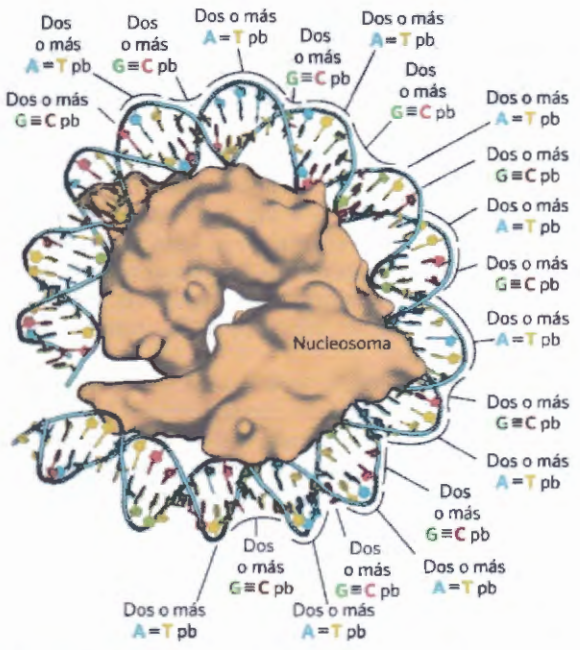


FIGURA 24-27 Efecto de la secuencia del DNA en la unión de los nucleosomas. () Los segmentos de dos o más pares de bases A = T facilitan la curvatura del DNA, mientras que los segmentos de dos o más pares de bases G ≡ C tienen el efecto opuesto. Cuando se encuentran separados por intervalos de diez pares de bases, los pares de bases A = T consecutivos facilitan la curvatura en círculo del DNA. Cuando pares de bases G≡C consecutivos están separados por 10 pb y desplazados 5 pb de los segmentos de A = T se favorece la unión del DNA al nucleosoma. [Fuente: PDB ID 1AOI, K. Luger et al., *Nature* 389:251, 1997.]

COPYSTATION

somas. Para el posicionamiento de determinados nucleosomas son necesarias proteínas distintas de las histonas. En varios organismos ciertas proteínas se unen a secuencias específicas del DNA y, de esta forma, facilitan la formación de un nucleosoma en su inmediata vecindad. Los nucleosomas se depositan sobre el DNA durante la replicación o en otros procesos que requieren el desplazamiento transitorio de los nucleosomas. La deposición de los nucleosomas parece producirse por etapas. En primer lugar se une un tetrámero de dos histonas H3 y dos H4 y a continuación se depositan los dímeros de H2A-H2B. La incorporación de los nucleosomas a los cromosomas después de la replicación cromosómica la facilita un complejo de **chaperonas de histonas,** que incluye proteínas conocidas como factor de ensamblaje de la cromatina (CAF1), RTT106 (*r*egulación de la *t*ransposición de *Ty*1) y una proteína conocida como factor 1 de antisilenciamiento (ASF1). Estos factores se unen a las variantes acetiladas de las histonas H3 y H4. No se conocen los detalles del mecanismo de deposición de los nucleosomas, aunque se sabe que partes de este complejo interaccionan directamente con partes de la maquinaria de replicación. Estos mismos complejos u otros semejantes pueden ayudar en la formación de los nucleosomas después de la reparación del DNA, la transcripción u otros procesos. Los **complejos de intercambio de histonas** permiten la sustitución de variantes de las histonas pòr histonas núcleo en algunas circunstancias. La correcta localización de estas variantes de histonas es importante. Se ha demostrado que los ratones que carecen de una de estas variantes de histonas mueren en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Recuadro 24-2). El posicionamiento preciso de los nucleosomas también juega un papel en la expresión de algunos genes eucarióticos (Capítulo 28).

Los nucleosomas se empaquetan en estructuras cromosómicas altamente condensadas

El enrollamiento del DNA alrededor del nucleosoma hace que la longitud del DNA se compacte unas siete veces. Pero, el grado de compactación final del cromosoma es de unas 10.000 veces, lo cual muestra claramente la existencia de órdenes superiores de organización estructural. In vitro, la moléculas de DNA con nucleosomas e histona H1 pueden plegarse en una estructura denominada **fibra de 30 nm (Fig. 24-28a).** En la Figura 24-28b se muestra un modelo de la organización de las histonas y el DNA en las fibras de 30 nm.

La fibra de 30 nm, ampliamente estudiada como potencial segundo nivel de organización de la cromatina, daría lugar a una compactación del DNA de unas 100 veces. Sin embargo, el examen minucioso de la cromatina in vivo no ha mostrado la presencia de fibras de 30 nm en las células. En cambio los cromosomas están condensados en un estado que podría describirse como glóbulo fractal (Fig. 24-28c). Las fibras de 10 nm se condensan plegándose sobre sí mismas. La condensación no está tan organizada como en la fibra de 30 nm, pero no es al azar. Un cromosoma humano de tamaño medio, de 135 millones de pares de bases, es suficientemente largo para

RECUADRO 24-2 MÉTODOS Epigenética, estructura de los nucleosomas y variantes de las histones

La información que pasa de una generación a la siguiente, a las células hijas en la división celular o de los progenitores a los descendientes sin estar codificada en las secuencias de DNA se conoce como información **epigenética**. En su mayor parte consiste en modificaciones covalentes de las histones y/o la localización de variantes de las histonas en los cromosomas.

Las regiones de la cromatina donde los genes se expresan activamente (transcripción) suelen estar parcialmente descondensadas y se denominan **eucromatina**. En estas regiones, en lugar de las histones H3 y H2A se encuentran las variantes H3.3 y H2AZ, respectivamente (Fig.1). Los complejos que depositan nucleosomas en el DNA con variantes de las histonas son similares a los que depositan nucleosomas con las histonas más comunes. Los nucleosomas que contienen la histona H3.3 son depositados por un complejo en el cual el factor 1 de ensamblaje de la cromatina (CAF1) ha sido reemplazado por la proteína HIRA (el nombre deriva de la clase de proteínas denominadas HIR, por represor de histonas). Tanto CAF1 como HIRA pueden considerarse como chaperonas de histones, que ayudan a la formación correcta y a la colocación de los nucleosomas. La secuencia de la H3.3 difiere de la H3 en sólo cuatro residuos aminoácidos, pero todos estos residuos tienen papeles determinantes en la descarga de las histonas.

Al igual que la histona H3.3, la H2AZ está asociada a un complejo de descarga específico diferente, y generalmente se encuentra en regiones de la cromatina con transcripción activa. La incorporación de H2AZ estabiliza el octámero del nucleosoma, pero impide ciertas interacciones cooperativas entre los nucleosomas, que son necesarias para compactar el cromosoma. Ello tiene como resultado una estructura cromosómica más abierta que facilita la expresión de los genes en las regiones donde se encuentra la H2AZ. El gen que codifica la H2AZ es esencial para los mamíferos. En la mosca del vinagre, la pérdida de H2AZ impide el desarrollo más allá de los estadios larvales.

Otra variante de la H2A, la H2AX, se asocia con la reparación del DNA y la recombinación genética. En los ratones, la ausencia de H2AX provoca inestabilidad genómica e infertilidad en los machos. La H2AX se encuentra dispersa en pequeñas cantidades por todo el genoma. Cuando se produce un corte de las dos cadenas del DNA, las moléculas cercanas de H2AX son fosforiladas en la Ser^{139} en la región carboxi-terminal. Si se bloquea experimentalmente esta fosforilación no se forman los complejos necesarios para la reparación del DNA.

La variante de la histona H3 denominada CENPA se asocia a las secuencias de DNA repetitivo de los centrómeros. La cromatina centromérica contiene las chaperonas de histonas CAF1 e HIRA. Ambas podrían estar implicadas en la formación de nucleosomas que contuviesen CENPA. La eliminación del gen de CENPA es letal para los ratones.

La función y el posicionamiento de las variantes de las histones pueden estudiarse con las técnicas de la genómica. Una técnica muy útil es la inmunoprecipitación de cromatina, o IP de cromatina (ChIP). Los nucleosomas que contienen una determinada variante de histona son precipitados con un anticuerpo que se una específicamente a esta variante. Estos nucleosomas pueden estudiarse aislados de su DNA, pero en general el DNA asociado se incluye en el estudio para determinar dónde se unen los nucleosomas estudiados. El DNA puede marcarse y usarse como sonda para examinar una micromatriz (microarray) (véase la Fig. 9-23) y obtener un mapa de las secuencias genómicas a las que estos nucleosomas concretos están unidos. Puesto que las micromatrices a

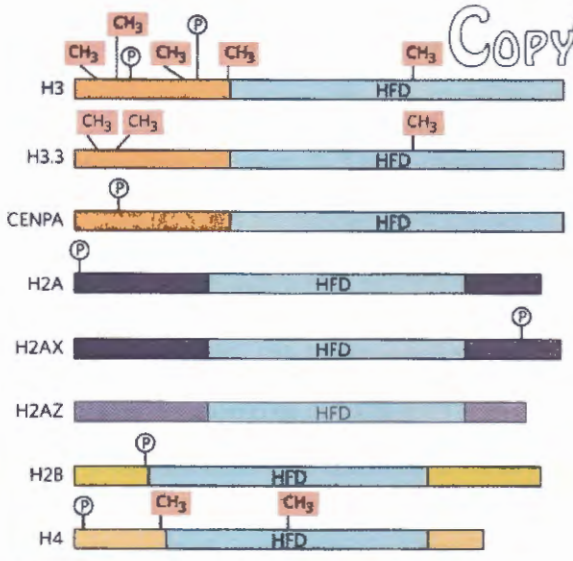


FIGURA 1 Se conocen diversas variantes de las histones H3, H2A y H2B. Aquí se muestran la histonas internas y unas pocas de sus variantes conocidas. Se indican los sitios de metilación de residuos Lys/Arg y de fosforilación de Ser. HDF indica el dominio con el plegamiento de histona, un motivo estructural compartido por todas las histones internas. Las regiones en otros colores indican las homologías estructurales y de secuencia. [Fuente: K. Sarma and D. Reinberg, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 6:139, 2005.]

COPY-STATION

menudo se denominan chips, esta técnica recibe el nombre de ChIP-chip (Fig. 2).

Las variantes de las histonas, junto con sus muchas modificaciones covalentes contribuyen a definir y a delimitar las funciones de la cromatina. Señalizan la cromatina, al facilitar o suprimir funciones específicas tales como la segregación de los cromosomas, la transcripción y la reparación del DNA. Las modificaciones de las histonas no desaparecen en la división celular o durante la meiosis y, por tanto, forman parte de la información transmitida de una generación a la siguiente en todos los organismos eucarióticos.

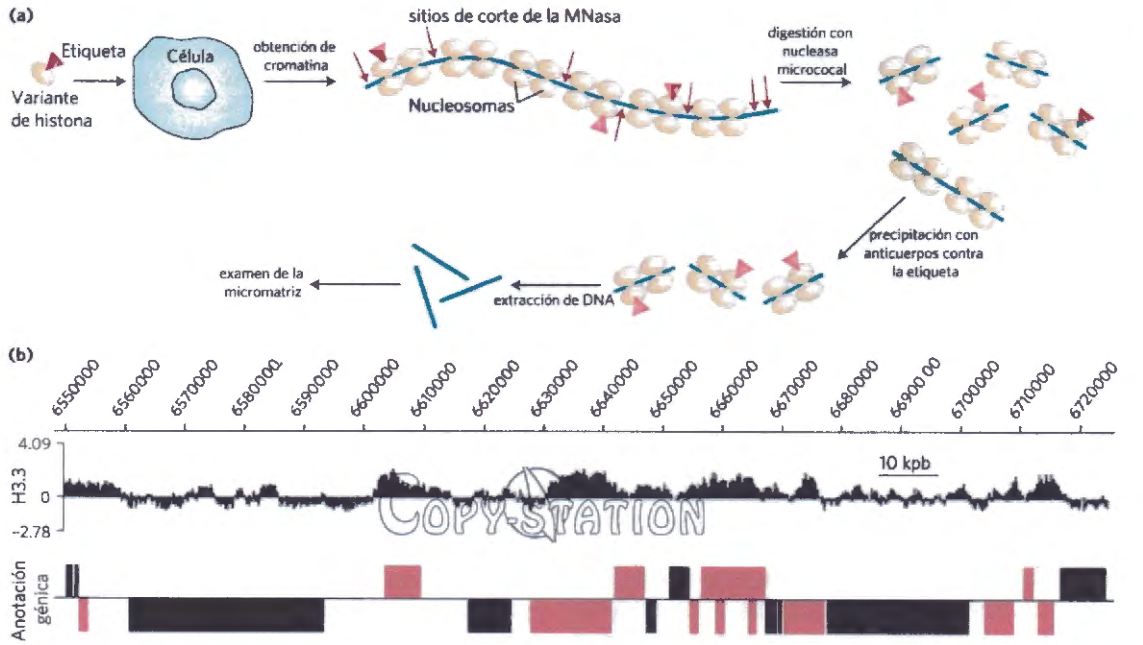


FIGURA 2 Diseño de un experimento de ChIP-chip para averiguar las secuencias de DNA genómico a las que se une una determinada variante de histona. **(a)** Una variante de histona con un epítopo (una proteína o estructura química reconocida por un anticuerpo; véanse los Capítulos 5 y 9) que hace las veces de etiqueta se introduce en un determinado tipo celular, en donde se incorpora a los nucleosomas. (En algunos casos el epítopo etiqueta es innecesario, pues se puede disponer de anticuerpos que se unen directamente a la modificación de la histona estudiada.) Se aísla cromatina de las células y se digiere brevemente con nucleasa micrococal (MNasa). El DNA unido a los nucleosomas se encuentra protegido frente a la digestión, pero el DNA internucleosomal es cortado, obteniéndose fragmentos de DNA unidos a uno o dos nucleosomas. Se añade un anticuerpo que se une al epítopo etiqueta con lo que la variante de histona etiquetada con el epítopo precipita selectivamente. Se extrae el DNA de los nucleosomas del precipitado, se marca y se usa como sonda para examinar una micromatriz que contenga parte o la totalidad de secuencias genómicas de este tipo celular particular. **(b)** En este ejemplo, la unión de la histona H3.3 se localiza en un corto segmento del cromosoma 2L de *Drosophila melanogaster*. Los números de la parte superior corresponden a la numeración de las posiciones de los nucleótidos en este brazo del cromosoma. Cada mancha en el microchip representa 100 pb de secuencia genómica, por tanto estos datos representan más de 1700 manchas individuales del microchip. En cada mancha, la señal del DNA marcado, precipitado con el anticuerpo contra la histona H3.3, se representa como la relación de esta señal con la señal control generada cuando se aísla DNA total sin inmunoprecipitación, que una vez fragmentado y marcado con una etiqueta de diferente color se usa para examinar el mismo microchip. Las señales por encima de la línea horizontal indican las posiciones genómicas en las que la unión de la histona H3.3 es superior a la del control. Las señales por debajo de la línea son regiones en las que está relativamente ausente la histona H3.3 Los genes anotados (conocidos) de este segmento del genoma se muestran en el panel inferior (barras gruesas). Las barras por encima de la línea representan los genes transcritos de 5′ a 3′, de izquierda a derecha, y las cajas por debajo de la línea se transcriben de derecha a izquierda. Las barras rojas corresponden a genes en los que la RNA polimerasa II también es abundante, lo que indica una transcripción activa. La unión de la histona H3.3 se concentra en y cerca de los genes activamente transcritos.[Fuente: Por cortesía de Steve Henikoff. Reproducido con la autorización de Y. Mito et al., *Nature Genet.* 37:1090, 2005.]

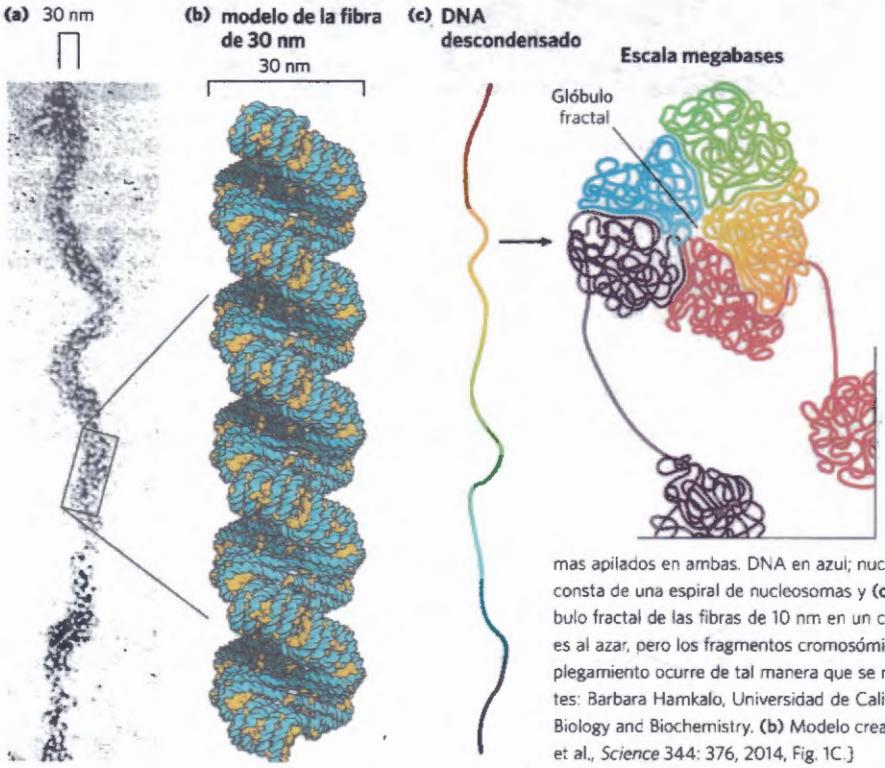


FIGURA 24-28 Estructura de orden superior de los nucleosomas. La fibra compacta está formada por nucleosomas densamente empaquetados. **(a)** La fibra de 30 nm vista con el microscopio electrónico. **(b)** Un modelo de la organización de los nucleosomas en la fibra de 30 nm. Dos fibras de 10 nm se enrollan una en torno de la otra, con los nucleosomas apilados en ambas. DNA en azul; nucleosomas en amarillo del solenoide que consta de una espiral de nucleosomas y **(c)** Organización del plegamiento en glóbulo fractal de las fibras de 10 nm en un cromosoma condensado. El plegamiento es al azar, pero los fragmentos cromosómicos vecinos permanecen asociados y el plegamiento ocurre de tal manera que se minimice la formación de nudos. [Fuentes: Barbara Hamkalo, Universidad de California, Irvine, Department of Molecular Biology and Biochemistry. **(b)** Modelo creado a partir de la información de F. Song et al., *Science* 344: 376, 2014, Fig. 1C.]

abarcar un núcleo de 10 um , más de 5000 veces. Por tanto, en principio los cromosomas podrían plegarse de tal manera que fragmentos de DNA separados por millones de pares de bases podrían estar situados uno junto a otro. Sin embargo, el plegamiento en general ocurre de forma que la distancia lineal se refleja en la distancia en la estructura plegada. Las características del plegamiento también deben evitar la formación de nudos. La actividad transcripcional puede disminuir el nivel de condensación, produciendo regiones relativamente abiertas. Las regiones transcripcionalmente inactivas y las regiones que carecen de genes están muy condensadas en una forma denominada **heterocromatina**.

Los niveles superiores de plegamiento no se conocen todavía con exactitud, pero parece ser que ciertas regiones del DNA se asocian a un armazón cromosómico (**Fig. 24-29**). Las regiones asociadas al armazón están separadas por bucles de DNA de entre 20 y 100 kpb. El DNA de estos bucles podría contener un conjunto de genes relacionados. El propio armazón puede contener varias proteínas, en particular topoisomerasa II y proteínas SMC, descritas más adelante. La presencia de la topoisomerasa II resalta todavía más la importancia de la relación entre el desenrollamiento del DNA y la estructura de la cromatina. La topoisomerasa II es tan importante en el mantenimiento de la estructura de la cromatina que los inhibidores de este enzima pueden matar rápidamente las células en división. Varios fármacos usados en la quimioterapia del cáncer son inhibidores de la topoisomerasa II, permiten que el enzima promueva la rotura de las hebras del DNA, pero no su ulterior unión (véase el Resumen 24-1).

Copy Station

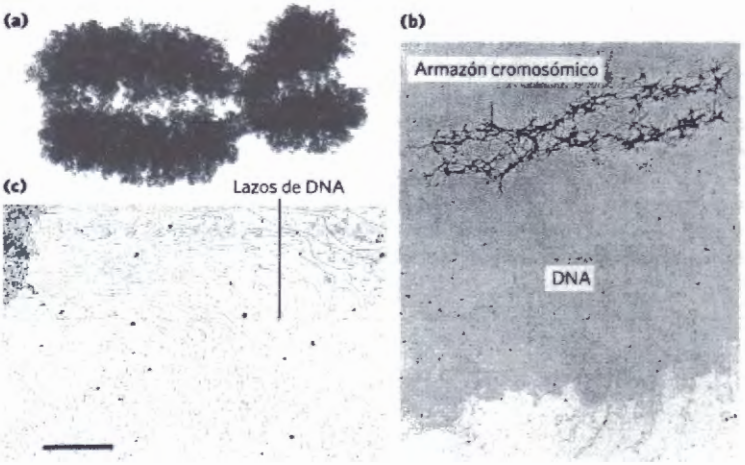
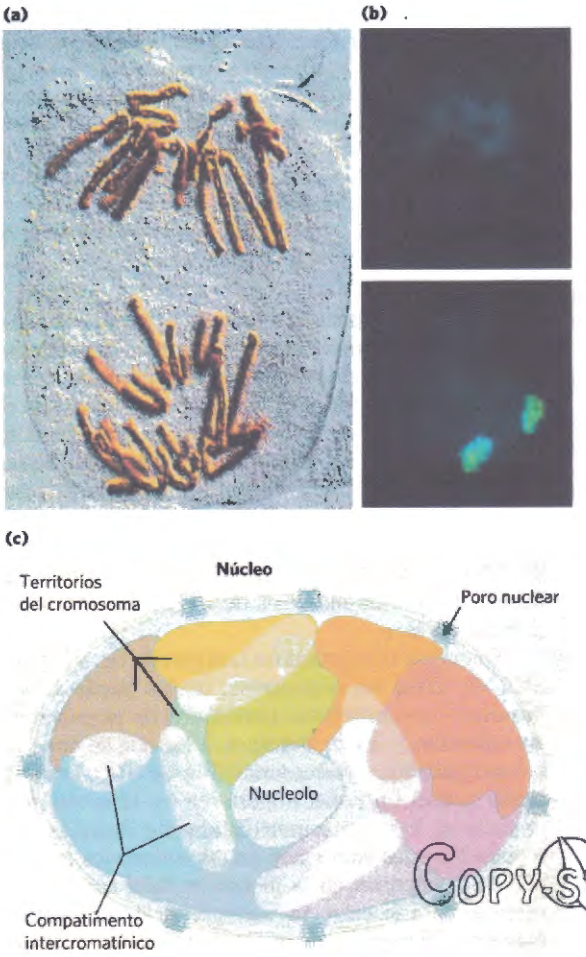


FIGURA 24-29 Lazos de DNA unidos a un armazón cromosómico. (a) Cromosoma hinchado producido en un tampón de baja fuerza iónica tal como puede verse en el microscopio electrónico. Observe la aparición de fibras de cromatina de 30 nm en los márgenes. **(b)** La extracción de las histonas deja un armazón cromosómico de naturaleza proteica rodeado por DNA desnudo. **(c)** El DNA está organizado en lazos unidos por su base al armazón en la esquina superior izquierda. Barra de escala = 1 ×m. Las tres imágenes tienen diferentes aumentos. [Fuentes: (a, b) Don W. Fawced/ Science Fuente. **(c)** U.K. Laemmli et al., Metaphase chromosome structure: The role of nonhistone proteins , *"Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42:351, 1978 c Cold Spring Harbor Laboratory Press.]

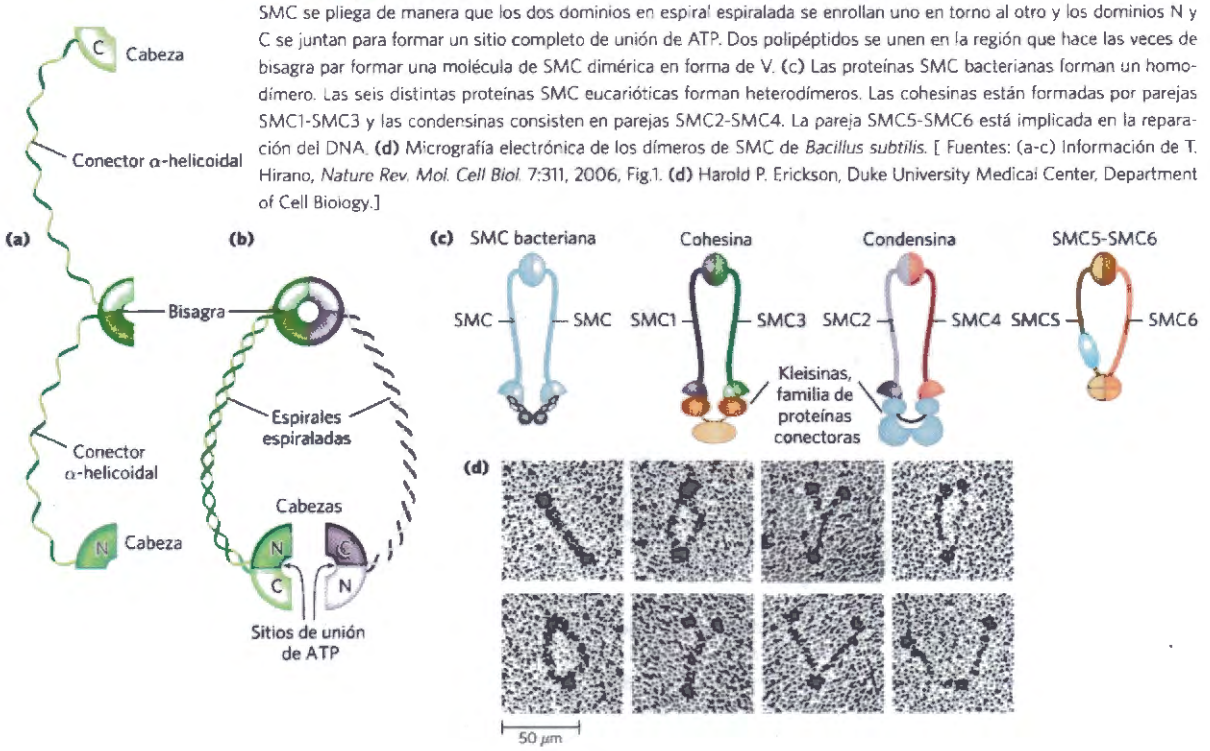
Hay niveles adicionales de organización en el núcleo eucariótico. Justo antes la división celular durante la mitosis, los cromosomas se observan condensados y altamente organizados. **(Figura 24-30a).** Durante la interfase los cromosomas tienen aspecto disperso (Fig 24-30b, arriba), pero no describen trayectorias al azar en el núcleo (Fig. 24-30b). Durante la intefase, cada cromosoma está circunscrito a un dominio subnuclear denominado **territorio cromosómico** (Fig. 24-30c). La localización exacta de los territorios cromosómicos varía según la célula en un organismo, pero algunos patrones son evidentes. Algunos cromosomas tienen una densidad de genes mayor que la de otros (por ejemplo, los cromosomas humanos 1, 16, 17, 19 y 229) y éstos tienden a tener su territorio en el centro del núcleo. Los cromosomas con más heterocromatina tienden a localizarse en la periferia del núcleo. La maquinaria transcripcional y los genes activos de cromosomas adyacentes a menudo se concentran en el espacio entre los cromosomas.



COPY-STATION

FIGURA 24-30 Organización cromosómica en el núcleo eucariótico. **(a)** Cromosomas condensados en la anafase mitótica de células de campánula *(Endymion sp).* **(b)** núcleos interfásicos de células epiteliales de cáncer de mama. El núcleo de la parte inferior se ha tratado para que sus dos copias del cromosoma 11 emitan fluorescencia verde. **(c)** Esquema de los territorios de un núcleo eucariótico. Los compartimentos intercromatínicos están enriquecidos en maquinaria transcripcional y tienen alrededor genes tanscripcionalmente activos. El nucleolo es un suborganelo dentro del núcleo donde los ribosomas son sintetizados y ensamblados (Capítulo 27). [Fuentes: **(a)** Pr. G. Giménez-Martín/ Fuente Science. **(b)** Karen Meaburn and Tom Misteli/National Cancer Institute.

FIGURA 24-31 Estructura de las proteínas SMC. **(a)** Las proteínas SMC tienen cinco dominios. **(b)** Cada polipéptido SMC se pliega de manera que los dos dominios en espiral espiralada se enrollan uno en torno al otro y los dominios N y C se juntan para formar un sitio completo de unión de ATP. Dos polipéptidos se unen en la región que hace las veces de bisagra par formar una molécula de SMC dimérica en forma de V. (c) Las proteínas SMC bacterianas forman un homodímero. Las seis distintas proteínas SMC eucarióticas forman heterodímeros. Las cohesinas están formadas por parejas SMC1-SMC3 y las condensinas consisten en parejas SMC2-SMC4. La pareja SMC5-SMC6 está implicada en la reparación del DNA. **(d)** Micrografía electrónica de los dímeros de SMC de *Bacillus subtilis.* [Fuentes: (a-c) Información de T. Hirano, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:311, 2006, Fig.1. **(d)** Harold P. Erickson, Duke University Medical Center, Department of Cell Biology.]



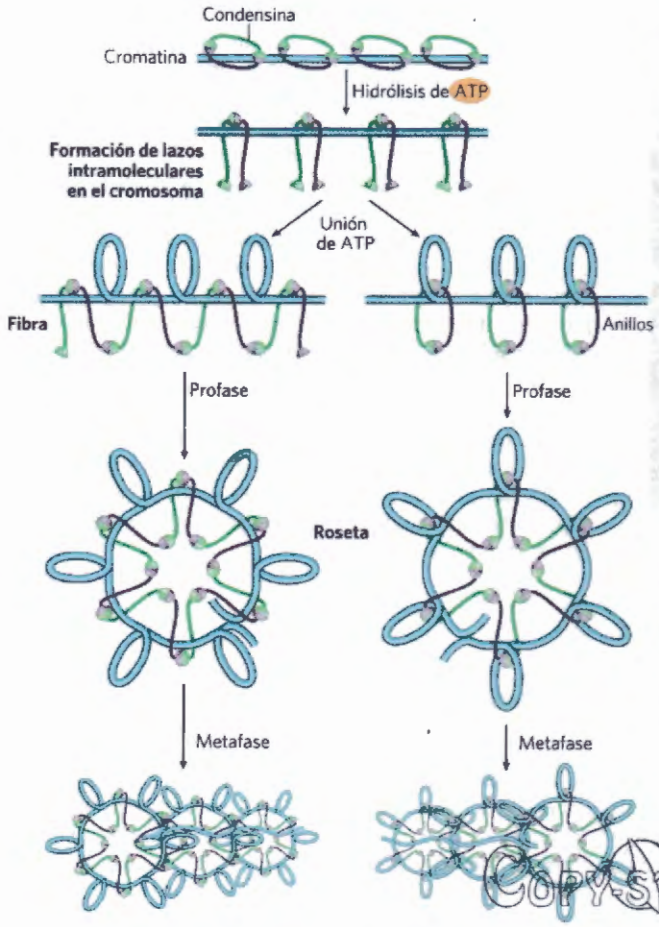


FIGURA 24-32 Posible papel de las condensinas en la condensación de la cromatina. Inicialmente, el DNA se une a la región que hace de bisagra en la proteína SMC, en el interior de la cual puede convertirse en un anillo de SMC intramolecular. La unión de ATP produce la asociación cabeza-cabeza, que forma lazos superhelicoidales en el DNA unido. A continuación, la reorganización de las interacciones cabeza-cabeza para formar rosetas condensa el DNA. Las condensinas pueden organizar la formación de lazos en los segmentos cromosómicos de diferentes maneras. Se muestran dos posibles modelos. [Fuente: Información de T. Hirano, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:311, 2006, Fig.6.]

Las estructuras de los cromosomas condensados se mantienen mediante proteínas SMC

Una tercera clase principal de proteínas de la cromatina, además de las histonas y las topoisomerasas, son las **proteínas SMC** (mantenimiento estructural de los cromosomas). La estructura primaria de las proteínas SMC consta de cinco dominios diferentes **(Figura 24-31a)**. Los dominios globulares amino- y carboxi-terminales, N y C, contribuyen, cada uno con una parte de un sitio para la hidrólisis de ATP, están conectados por dos regiones en hélice-α espiraladas una en torno de la otra (véase la Fig. 4-11), unidas por un dominio bisagra. Estas proteínas son generalmente diméricas y forman un complejo en forma de V, que posiblemente se mantiene unido a través de los dominios bisagra (Fig. 24-31b). Un dominio N y un dominio C se unen para formar un sitio de hidrólisis de ATP completo en cada extremo de la V.

Se encuentran proteínas pertenecientes a la familia SMC en todos los organismos, de las bacterias a los humanos. Los eucariotas tienen dos tipos principales, las cohesinas y las condensinas, a las que se unen proteínas reguladoras y accesorias (Fig. 24-31c). Las **cohesinas** juegan un papel importante en la unión de las cromátidas hermanas inmediatamente después de la replicación y las mantienen juntas cuando los cromosomas se condensan en la metafase. Esta asociación es esencial para la correcta segregación de los cromosomas en la división celular. Se cree que las cohesinas, junto con una tercera proteína, la kleisina, forman un anillo alrededor de los cromosomas replicados que los unen hasta que se requiere la separación en la división celular. El anillo se puede expandir y contraer en respuesta a la hidrólisis de ATP. Las **condensinas** son esenciales para la condensación de los cromosomas cuando las células entran en la mitosis. En el laborato-

COPYSTATION

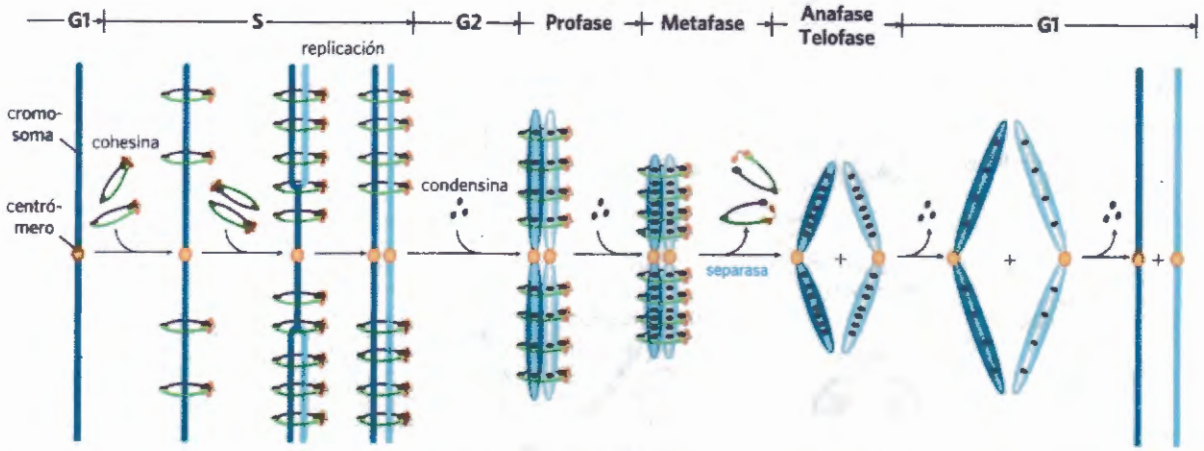


FIGURA 24-33 Papeles de las cohesinas y las condensinas en el ciclo celular eucariótico. Las cohesinas se incorporan a los cromosomas durante la fase G1 (véase la Fig. 24-23), manteniendo las cromátidas hermanas unidas durante la replicación. Las condensinas se unen al inicio de la mitosis y mantienen las cromátidas en un estado condensado. Durante la anafase, el enzima separasa elimina los enlaces de cohesina. Una vez separadas las cromátidas, las condensinas empiezan a disociarse y los cromosomas hijos vuelven al estado descondensado. [Fuente: Información de D.P. Bazett-Jones et al., *Mol. Cell* 9: 1193, 2002, Fig. 5.]



FIGURA 24-34 Nucleoides de células de *E. coli*. El DNA de estas células está teñido con un colorante que emite fluorescencia cuando se expone a luz UV. El área clara corresponde al nucleoide. Obsérvese que algunas células han replicado su DNA sin haberse producido todavía la división celular, y por ello presentan múltiples nucleoides. [Lars Renner.]

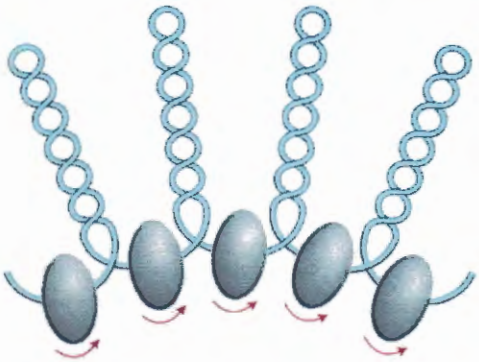


FIGURA 24-35 Dominios en forma de lazo del cromosoma de *E. coli*. Cada dominio tiene unos 10.000 pb de longitud. Los dominios no son estáticos, sino que se mueven a lo largo del DNA a medida que avanza la replicación. Barreras de composición desconocida en los límites de los dominios impiden la relajación del DNA más allá de los límites del dominio donde se haya producido el corte de una hebra del DNA. Los complejos putativos en los límites de los dominios están representados por ovoides grises. Las flechas indican el movimiento del DNA a través de los complejos.

rio, las condensinas se unen al DNA y forman vueltas superhelicoidales positivas; es decir la unión de las condensinas provoca un enrollamiento adicional del DNA, al contrario del subenrollamiento inducido por la unión de los nucleosomas. En la **Figura 24-32** se muestra un modelo del papel de las condensinas en la compactación de la cromatina. Las cohesinas y las condensinas son esenciales en la coordinación de los numerosos cambios en la estructura de los cromosomas durante el ciclo celular eucariótico **(Fig. 24-33)**.

COPY-STATION

El DNA bacteriano también se encuentra altamente organizado

Comentaremos brevemente la estructura del cromosoma bacteriano. El DNA bacteriano se compacta formando una estructura llamada **nucleoide**, que ocupa una parte significativa del volumen celular **(Fig. 24-34)**. El DNA parece estar unido por uno o más puntos a la superficie interior de la membrana plasmática. Se conoce mucho menos acerca de la estructura del nucleoide que de la cromatina eucariótica, pero poco a poco se van conociendo los detalles de una compleja organización. En *E. coli*, hay una estructura tipo armazón que organiza el cromosoma *circular* en una serie de unos 500 dominios lobulares, cada uno con un promedio de unos 10.000 pb **(Fig. 24-35)**, similares a los descritos anteriormente para la cromatina. Los dominios están fijados topológicamente; por ejemplo, si el DNA se corta en un dominio sólo se relajará el DNA de este dominio. Los dominios no tienen extremos fijos, sino que probablemente sus límites se encuentran en constante movimiento a lo largo del DNA, coordinados con la replicación del DNA. No parece que la organización local producida por los nucleosomas en los eucariotas tenga parangón en el DNA bacteriano. En *E. coli* abundan las proteínas similares a las histonas, y el ejemplo mejor caracterizado es una proteína de dos subunidades denominada HU (M_r 19.000). Sin embargo, estas proteínas se unen y se disocian en pocos minutos y no se ha encontrado ninguna estructura estable y regular tipo DNA-histona. El cromosoma bacteriano es una estructura relativamente dinámica, lo que refleja posiblemente la necesidad de un acceso más rápido a la información genética que contiene. El ciclo de división de la célula bacteriana puede durar tan solo 15 min, mientras que una célula eucariótica típica puede permanecer sin dividirse durante horas o incluso meses. Además, una fracción mucho mayor del DNA bacteriano codifica proteínas o RNA y las elevadas tasas del metabolismo celular de las bacterias indican que, en un determinado momento, se está transcribiendo o replicando una mayor proporción de DNA que en la mayoría de células eucarióticas.

Después de esta visión general de la complejidad de la estructura del DNA, nos encontramos en disposición de abordar su metabolismo en el capítulo siguiente.

RESUMEN 24.3 La estructura de los cromosomas

- La unidad fundamental de organización de la cromatina de las células eucarióticas es el nucleosoma, formado por histonas y un segmento de DNA de 200 pb. Una partícula proteica núcleo con ocho histonas (dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) está rodeado por un segmento de DNA (de unos 146 pb) en forma de superhélice levógira solenoidal.
- Los nucleosomas pueden formar fibras de 30 nm in vitro, pero esta estructura no se ha encontrado en las células. El plegamiento de orden superior requiere la unión a un armazón cromosómico. Los cromosomas individuales se encuentran confinados en dominios subnucleares denominados territorios. La histona H1, la topoisomerasa II y, principalmente cohesinas y condensinas, tienen un importante papel en el mantenimiento de la organización cromosómica durante todas las etapas del ciclo celular.
- Los cromosomas bacterianos también están densamente compactados en el nucleoide, pero el cromosoma posee una estructura mucho más dinámica e irregular que la cromatina eucariótica, de acuerdo con un ciclo celular más corto y el muy activo metabolismo de las células bacterianas.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

cromosoma 951
fenotipo 951
mutación 951
gen 952
secuencia reguladora 952
plásmido 953
intrón 956
exón 956
DNA de secuencia simple 956
DNA satélite 956
centrómero 956
telómero 956
vuelta superhelicoidal 957
DNA relajado 957
topología 958
Subenrollamiento 959
número de enlace 959
diferencia de enlace específica 960
densidad superhelicoidal (σ) 960
topoisómeros 961
torsión 961
retorcimiento 961
topoisomerasas 961
plectonémico 964
solenoidal 964
cromatina 966
histonas 966
nucleosoma 966
epigenético 970
eucromatina 970
fibra de 30 nm 969
proteínas SMC 974
cohesinas 974
condensinas 974
nucleoide 975

Problemas

1. Empaquetamiento del DNA en un virus El DNA del bacteriófago T2 tiene una masa molecular de 120 x 10^6 y se encuentra confinado en una cabeza de unos 210 nm de longitud. Considerando que la masa molecular de un par de nucleótidos es de 650, calcule la longitud del DNA y compárela con la longitud de la cabeza del fago T2.

2. El DNA del fago M13 El DNA del bacteriófago M13 tiene la siguiente composición de bases: A, 23%; T, 36%, G, 21%; C, 20%. ¿Qué nos dicen estos datos acerca del DNA de este fago?

3. El genoma de *Mycoplasma* El genoma completo de la bacteria más simple conocida, *Mycoplasma genitalium*, es una molécula de DNA circular de 580.070 pb. Calcule la masa molecular y la longitud de contorno de la molécula relajada. ¿Cuál es el valor de Lk_0 del cromosoma de *Mycoplasma*? Si σ = -0,06 ¿cuál el valor de *Lk*?

4. El tamaño de los genes eucarióticos Un enzima aislado de hígado de rata tiene 192 residuos aminoácidos y está codificado por un gen de 1440 pb. Explique la relación existente entre el número de residuos aminoácidos del enzima y el número de pares de nucleótidos del gen.

5. El número de enlace Una molécula de DNA circular cerrado tiene un *Lk* de 500 en forma relajada. ¿Cuál es el número aproximado de pares de bases de este DNA? ¿Cómo se altera el número de enlace (aumenta, disminuye, no varía, no está definido) cuando: (a) se une a un complejo proteico para formar un nucleosoma; (b) una de las hebras del DNA está cortada; (c) se añaden DNA girasa y ATP a la disolución de DNA; (d) se desnaturaliza la doble hélice por calor?

6. Topología del DNA En presencia de una condensina eucariótica y una topoisomerasa de tipo II, el *Lk* de una molécula de DNA circular cerrada y relajada no cambia. Sin embargo, el DNA resulta densamente anudado.

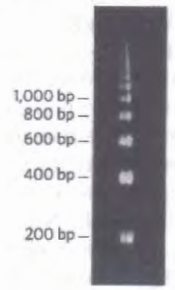


La formación de nudos requiere la rotura del DNA, el paso de un segmento de DNA a través de la rotura y la religación por la topoisomerasa. Dado que se esperaría que cada acción de la topoisomerasa resultase en un cambio del número de enlace, ¿cómo puede *Lk* mantenerse constante?

7. Densidad superhelicoidal El bacteriófago λ infecta *E. coli* integrando su DNA en el cromosoma bacteriano. El éxito de esta recombinación depende de la topología del DNA de *E. coli*. Cuando la densidad superhelicoidal (σ) del DNA de *E. coli* es superior a –0,045, la probabilidad de integración es <20%; cuando σ es inferior a -0,06 la probabilidad es -70%. Un DNA plasmídico aislado de un cultivo de *E. coli* tiene 13.800 pares de bases y un *Lk* de 1,222. Calcule el valor de σ de este DNA y pronostique la probabilidad de que el bacteriófago λ pueda infectar este cultivo.

8. Modificación del número de enlace (a) ¿Cuál es el *Lk* de una molécula de DNA circular de doble cadena de 5.000 pb con un corte en una de las cadenas? (b) ¿Cuál es el *Lk* de la molécula en (a) cuando se cierra el corte (relajada)? (c) ¿Cómo se modificaría el *Lk* de la molécula (b) por acción de una única molécula de topoisomerasa I de *E. coli*? (d) ¿Cuál es el *Lk* de la molécula en (b) después de ocho ciclos enzimáticos de una molécula de DNA girasa en presencia de ATP? (e) ¿Cuál es el *Lk* de la molécula en (d) después de cuatro ciclos enzimáticos de una sola molécula de topoisomerasa I bacteriana? (f) ¿Cuál es el *Lk* de la molécula en (d) después de la unión de un nucleosoma?

9. Cromatina Una de los primeros experimentos que ayudaron a definir la estructura del nucleosoma se muestra en este gel de agarosa, en el cual las bandas gruesas representan al DNA. Este resultado se obtuvo tratando brevemente la cromatina con un enzima que degrada el DNA, eliminando a continuación las proteínas y analizando el DNA purificado por electroforesis. Los números al lado del gel muestran la posición en la que migraría un DNA lineal del tamaño indicado. ¿Qué nos dice este gel sobre la estructura de la cromatina? ¿Cuál es la razón de que las bandas sean gruesas y difusas en lugar de estar bien definidas?



[Fuente: Cortesía de Dr. Roger D. Kornberg, Stanford University School of Medicine.]

10. Estructura del DNA Explique de qué modo el subenrollamiento de la hélice del B-DNA puede facilitar o estabilizar la formación de Z-DNA.

11. Estabilidad de la estructura del DNA (a) Describa dos características estructurales necesarias para que una molécula de DNA mantenga la forma negativamente espiralada. (b) Enumere

tres cambios estructurales que son más favorables cuando la molécula está superespiralada negativamente. (c) ¿Qué enzima con ayuda de ATP puede generar superhelicidad negativa en el DNA? (d) Describa el mecanismo físico de acción del enzima.

12. Cromosomas artificiales de levadura (YAC) Los YAC se usan para el clonaje de trozos grandes de DNA en células de levadura. ¿Qué tres tipos de secuencias de DNA son necesarios para asegurar la correcta replicación y propagación de un YAC en una célula de levadura?

13. La estructura del nucleoide de las bacterias En las bacterias, la trascripción de una parte de sus genes se ve afectada por la topología del DNA. La transcripción aumenta o disminuye (más a menudo) cuando el DNA está relajado. Cuando se corta un cromosoma bacteriano con un enzima de restricción en un sitio específico (una que corte una secuencia larga, y por lo tanto escasa), sólo los genes cercanos (dentro de 10.000 pb) muestran un aumento o una disminución de la expresión. La transcripción de los genes en otros lugares del cromosoma no se ve afectada. Encuentre una explicación (Sugerencia: vea la Fig. 24-36).

14. Topología del DNA Cuando se analiza el DNA por electroforesis en gel de agarosa, las moléculas cortas migran más rápidamente que las más largas. Los DNA circulares cerrados del mismo tamaño pero de diferente número de enlace también se pueden separar en gel de agarosa: los topoisómeros más superenrollados y por lo tanto más condensados, migran más rápidamente a través del gel. En el gel que se muestra más abajo, un DNA plasmídico purificado ha migrado de arriba abajo. Se observan dos bandas, la más rápida mucho más intensa.

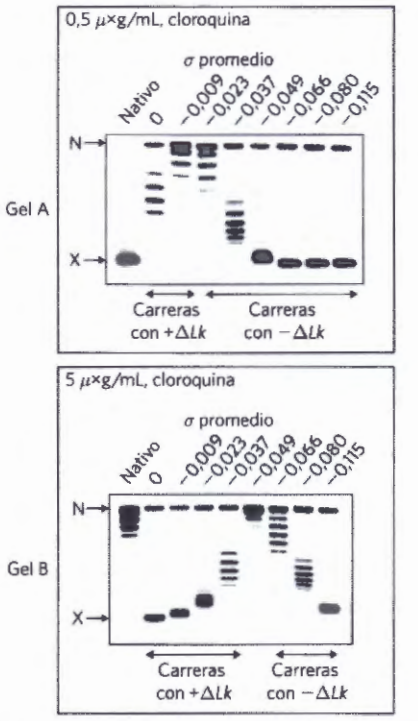


[Fuente: Cortesía de Michael Cox Laboratory.]

COPY-STATION

(a) ¿Cuáles son las especies de DNA en las dos bandas? (b) Si se añade topoisomerasa I a una disolución de este DNA ¿qué sucederá con las bandas superior e inferior después de la electroforesis? (c) Si se añade DNA ligasa al DNA ¿cambiará la apariencia de las bandas? Justifique su respuesta. (d) Si se añade DNA girasa y ATP después de la DNA ligasa ¿cómo cambiará el patrón de bandas?

15. Topoisómeros del DNA Cuando el DNA se analiza por electroforesis en geles de agarosa, las moléculas más cortas migran más deprisa que las largas. El DNA circular cerrado del mismo tamaño, pero de diferente número de enlace, también puede separarse en gel de agarosa: los topoisómeros más superespiralados y, por tanto, más condensados, migran más deprisa a través del gel; de arriba abajo en los geles mostrados a la derecha. Los geles contienen un colorante, cloroquina. La cloroquina se intercala entre los pares de bases y estabiliza una estructura del DNA más subenrollada. Cuando el colorante se une a un DNA circular cerrado relajado, el DNA se subenrolla en el lugar de unión del colorante y, en compensación, las regiones no unidas adquieren vueltas superhelicoidales positivas. En el experimento que aquí se muestra, se usaron topoisomerasas para obtener preparaciones del mismo círculo de DNA con diferentes densidades superhelicoidales (σ). El DNA completamente relajado migró en la posición N (DNA mellado) y el DNA altamente superespiralado (por encima del límite para distinguir los topoisómeros individuales) en la posición marcada con una X.



[Fuente: R. P. Bowater (2005) "Supercoiled DNA: structure," in *Encyclopedia of Life Sciences*, doi:10.1038/npg.els.0006002, John Wiley & Sons, Inc./Wiley InterScience. www.els.net.]

(a) En el gel A, ¿Por qué el carril correspondiente a $\sigma = 0$ (es decir, DNA preparado para que como promedio $\sigma = 0$) tiene múltiples bandas?

(b) En el gel B, ¿El DNA de la preparación $\sigma = 0$ se encuentra positiva o negativamente espiralado en presencia del colorante intercalado?

(c) En ambos geles, el carril correspondiente a $\sigma = -0.115$ tiene dos bandas, una de DNA altamente superespiralado y otra de DNA relajado. Proponga una explicación para la presencia de DNA relajado en estos (y otros) carriles.

(d) El DNA nativo (el carril más a la izquierda en cada gel) es el mismo DNA circular aislado de las bacterias y no sometido a ningún tratamiento. ¿Cuál es la densidad superhelicoidal aproximada de este DNA nativo?

16. Nucleosomas El genoma humano posee poco más de 3.100 millones de pares de bases. Suponiendo que esté cubierto de nucleosomas que se encuentren espaciados tal como se describe en este capítulo ¿cuántas moléculas de histona H2A están presentes en una célula somática humana? (No tenga en cuenta la disminución de H2A debida a su sustitución en algunas regiones por variantes de la H2A) ¿Cómo cambiaría el número después de la replicación del DNA, pero antes de la división celular?

Problema de análisis de datos

17. Determinación de los elementos funcionales de los cromosomas de levadura La Figura 24-8 muestra los elementos estructurales principales de un cromosoma de levadura de panadero (*Saccharomyces cerevisiae*). Heiter, Mann, Snyder y Davies (1985) determinaron las propiedades

de alguno de estos elementos. Basaron su estudio en el hallazgo que en las células de levadura los plásmidos (que tienen genes y un origen de replicación) se comportan de forma distinta de los cromosomas (que además de estos elementos poseen centrómeros y telómeros) durante la mitosis. Los plásmidos no son considerados por el aparato mitótico y se segregan al azar entre las células hijas. En ausencia de un marcador seleccionable que fuerce las células huésped a retenerlos (véase la Fig. 9-4), estos plásmidos se pierden rápidamente. Contrariamente, los cromosomas, incluso sin un marcador seleccionable son manipulados por el aparato mitótico y se pierden muy lentamente (alrededor de 10^{-6} por división celular).

Heiter y colaboradores se propusieron determinar los componentes importantes de los cromosomas de levadura construyendo plásmidos que contenían diversas partes de los cromosomas y observando si estos "cromosomas sintéticos" se segregaban correctamente durante la mitosis. Para medir las tasas de los diferentes tipos de segregación cromosómica incorrecta se necesitaba un ensayo rápido para determinar el número de copias de los cromosomas sintéticos presentes en las diferentes células. Este ensayo aprovechó que las colonias de levadura de tipo salvaje son blancas, mientras que ciertos mutantes que necesitan adenina (ade$^-$) forman colonias rojas en medio nutritivo. Concretamente, las células *ade2*$^-$ carecen de AIR carboxilasa (el enzima del paso (6a) de la Figura 22-35) funcional y acumulan AIR (5-aminoimidazol ribonucleótido) en su citoplasma. Este exceso de AIR se convierte en un pigmento rojo característico. La otra parte del ensayo involucraba el gen *SUP11*, que codifica un supresor ocre (un tipo de supresor sin sentido; véase el Recuadro 27-4) que suprime el fenotipo de algunos mutantes *ade2*$^-$.

Heiter y colaboradores empezaron con una cepa diploide de levadura homocigótica para *ade2*$^-$; estas células son rojas. Cuando las células mutantes contienen una copia de *SUP11*, el defecto metabólico se suprime parcialmente y las células son rosas. Cuando las células contienen dos o más copias de *SUP11*, el defecto es completamente suprimido y las células son blancas.

Los investigadores insertaron una copia de *SUP11* en cromosomas sintéticos que contenían varios elementos supuestamente importantes en la función cromosómica y a continuación observaron cuán eficazmente estos cromosomas pasaban de una generación a la siguiente. Estas células rosas fueron sembradas en medio no selectivo y se observó el comportamiento de los cromosomas sintéticos. Concretamente, Heiter y colaboradores buscaron colonias en las que los cromosomas sintéticos se segregasen incorrectamente en la primera división después de la siembra en placa, dando lugar a una colonia con una mitad de un fenotipo y una mitad de otro. Puesto que las células de levadura no son móviles, se tratará de una colonia con dos sectores, la mitad de un color y la otra mitad de otro color.

(a) Una razón para el fracaso de la mitosis es la *falta de disyunción*: el cromosoma se replica, pero las cromátidas hermanas no logran separarse, de modo que ambas copias del cromosoma acaban en la misma célula hija. Explique por qué la falta de disyunción del cromosoma sintético produciría una colonia mitad roja y mitad blanca.

La mitosis también puede fracasar por *pérdida cromosómica*: el cromosoma no entra en la célula hija o no se replica. Explique por qué la pérdida del cromosoma sintético produciría una colonia mitad roja y mitad rosa.

Contando la frecuencia de los diferentes tipos de colonias, Heiter y colaboradores pudieron estimar la frecuencia de estos procesos mitóticos aberrantes con diferentes tipos de cromosomas sintéticos. Primeramente, exploraron la necesidad de secuencias centroméricas, construyendo cromosomas sintéticos con fragmentos de DNA de distinto tamaño que contenían un centrómero conocido. Los resultados se muestran a continuación.

Cromosoma sintético	Tamaño del fragmento que contiene el centrómero (kpb)	Pérdida cromosómica (%)	Falta de disyunción (%)
1	Ninguno	—	>50
2	0,63	1,6	1,1
3	1,6	1,9	0,4
4	3,0	1,7	0,35
5	6,0	1,6	0,35

(c) A partir de estos datos, ¿qué conclusión puede sacarse acerca del tamaño del centrómero necesario para la segregación mitótica normal? Justifique la respuesta.

Conviene señalar que todos los cromosomas sintéticos usados en estos experimentos eran circulares y carecían de telómeros. Explique cómo podían replicarse más o menos correctamente.

A continuación, Heiter y colaboradores construyeron una serie de cromosomas sintéticos lineales que incluían la secuencia centromerica funcional y los telómeros, y midieron la tasa total (% de pérdida + % falta de disyunción) de fracaso mitótico en función del tamaño:

Cromosoma sintético	Tamaño (kpb)	Frecuencia de error total (%)
6	15	11,0
7	55	1,5
8	95	0,44
9	137	0,14

(e) A partir de estos datos, ¿qué conclusión puede sacarse acerca del tamaño cromosómico necesario para la segregación mitótica normal? Explique su razonamiento.

(f) Los cromosomas de levadura normales son lineales, poseen una longitud de 250 a 2.000 kpb y tienen un índice de fracaso mitótico de alrededor de 10^{-6} por división celular. Extrapolando los resultados de (e), ¿explican las secuencias centroméricas y teloméricas usadas en estos experimentos la estabilidad mitótica de los cromosomas normales de levadura o, por el contrario, han de estar implicados otros elementos? Justifique su razonamiento (Sugerencia: una gráfica del log de la tasa de error vs. la longitud será de utilidad).

Referencia

Heiter, P., C. Mann, M. Snyder, and R.W. Davis. 1985. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* 40:381–392.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 25

Metabolismo del DNA

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

25.1 Replicación del DNA 981

25.2 Reparación del DNA 996

25.3 Recombinación del DNA 1005

Como depositario de la información genética, el DNA ocupa un lugar central y único entre las macromoléculas biológicas. Las secuencias de nucleótidos del DNA codifican la estructura primaria de todos los RNA y proteínas celulares y, por mediación de los enzimas, puede influir indirectamente en la síntesis del resto de constituyentes celulares. Este paso de información desde el DNA al RNA y a las proteínas determina el tamaño, forma y función de todos los seres vivos.

El DNA es un admirable dispositivo para el almacenamiento estable de la información genética. La expresión "almacenamiento estable" da, no obstante, una imagen estática y engañosa pues no evoca la complejidad de los procesos implicados en el mantenimiento de la integridad del mensaje genético y su transmisión de una generación de células a la siguiente. El metabolismo del DNA comprende el proceso mediante el cual se hacen copias fieles de las moléculas de DNA (replicación), junto a los procesos que afectan la estructura inherente a la información (reparación y recombinación). El conjunto de estas actividades constituye el objeto de este capítulo.

Las características del metabolismo del DNA están determinadas por la necesidad de un alto grado de precisión. La química de la unión de un nucleótido al siguiente es elegante y simple aunque engañosa. No obstante, tal como sucede en la síntesis de todas las macromoléculas que contienen información la formación de un enlace covalente entre dos unidades monoméricas es sólo una pequeña parte del proceso bioquímico. Tal como veremos, la complejidad aparece en forma de elementos enzimáticos que aseguran la incorporación del nucleótido *correcto* de modo que la información genética se transmite intacta. En la síntesis del DNA, los errores no corregidos pueden tener consecuencias funestas, no sólo porque pueden afectar permanentemente o eliminar la función de un gen, sino también porque el cambio es hereditario.

Los enzimas que sintetizan el DNA han de copiar moléculas que contienen millones de bases. Lo hacen con fidelidad y velocidad extraordinarias, a pesar de que el sustrato DNA está muy compactado y unido a otras proteínas. Los enzimas que catalizan la síntesis de los enlaces fosfodiéster para unir nucleótidos en el armazón del DNA son, por tanto, solamente una parte de un elaborado sistema en el que intervienen multitud de proteínas y enzimas.

La reparación del DNA tiene como objetivo mantener la integridad de la información genética. Tal como se detalla en el Capítulo 8, el DNA puede ser objeto de muchos tipos de reacciones que pueden dañarlo. Estas reacciones son infrecuentes pero, sin embargo, son importantes debido a la baja tolerancia biológica a los cambios en la secuencia del DNA. El DNA es la única molécula que dispone de mecanismos de reparación; su número, diversidad y complejidad reflejan la amplia gama de agresiones que pueden afectarlo.

Las células pueden reordenar su información genética mediante procesos colectivamente designados como recombinación, en aparente contradicción con el principio según el cual la estabilidad y la integridad de la información genética son prioritarias. Sin embargo, la mayoría de reordenamientos del DNA contribuyen, de hecho, al mantenimiento de la integridad del genoma en la replicación, la reparación del DNA y la segregación de los cromosomas.

En este capítulo se concede una especial atención a los *enzimas* del metabolismo del DNA. Merecen un estudio cuidadoso tanto por su importancia biológica intrínseca como por su uso habitual en las modernas tecnologías bioquímicas. Muchos de los descubrimientos más importantes sobre el metabolismo del DNA se han hecho en *Escherichia coli*; por lo que algunos de sus enzimas mejor conocidos se usan generalmente para ilustrar los principios básicos. Una rápida ojeada al mapa genético de *E. coli* **(Fig. 25-1)** da sólo una somera idea de la complejidad de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del DNA.

Antes de pasar al estudio detallado de la replicación, hemos de hacer una breve digresión sobre el uso de las abreviaturas en la nomenclatura de genes y proteínas bacterianos, de uso frecuente en éste y otros capítulos.

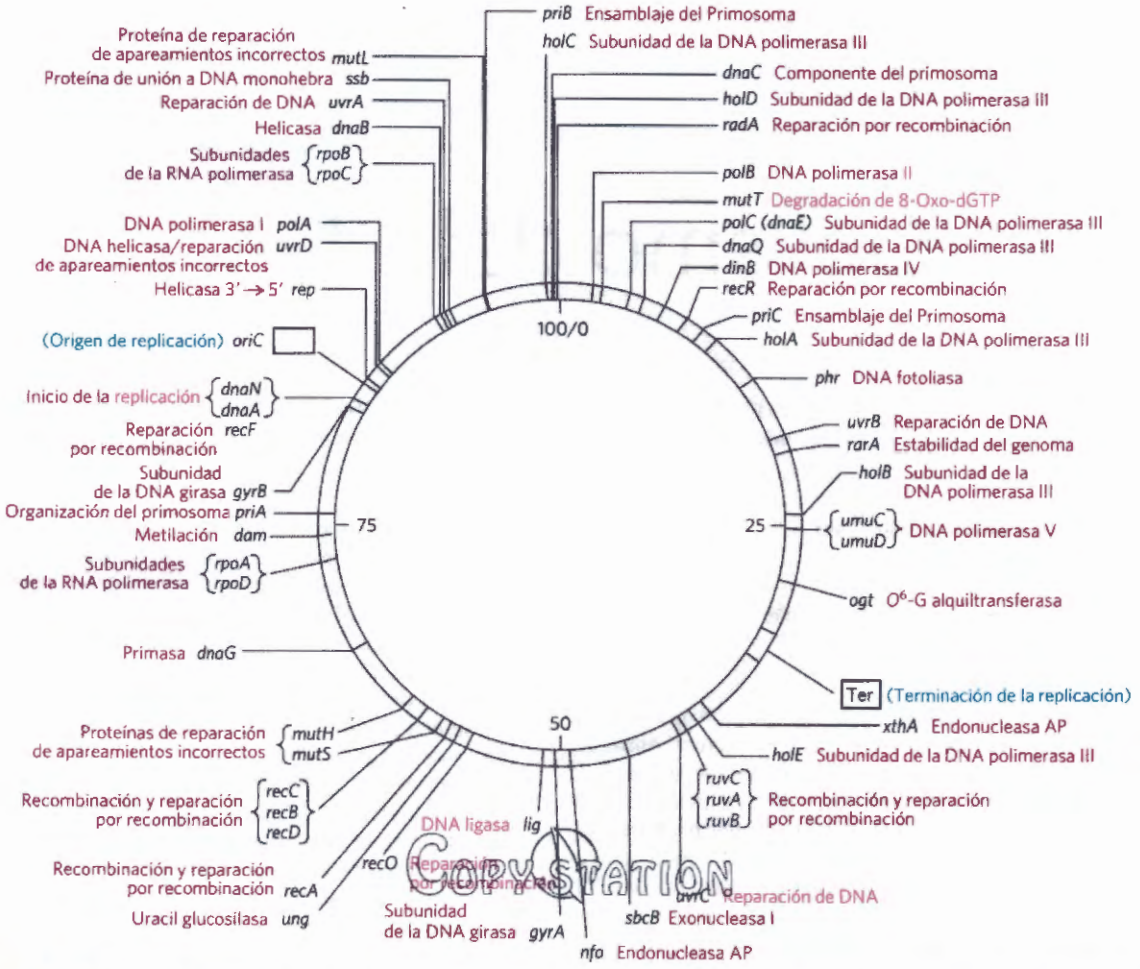


FIGURA 25-1 Mapa del cromosoma de *E. coli*. El mapa muestra las posiciones relativas de los genes que codifican muchas de las proteínas importantes en el metabolismo del DNA. El número de genes implicados da una idea de la complejidad de estos procesos. Los números de 0 a 100 dentro del cromosoma circular indican una medida genética denominada minutos. Cada minuto corresponde a unos 40.000 pb a lo largo de la molécula de DNA. Los nombres de tres letras de los genes y otros elementos reflejan generalmente algún aspecto de su función. Entre ellos se cuentan *mut*, mutagénesis; *dna*, replicación del DNA; *pol*, DNA polimerasa; *rpo*, RNA polimerasa; *uvr*, resistencia a UV; *rec*, recombinación; *dam*, metilación de la adenina del DNA; *lig*, DNA ligasa; Ter, terminación de la replicación; y ori, origen de la replicación (*oriC* en *E. coli*, tal como se muestra aquí).

» **Convención clave:** los genes bacterianos se nombran generalmente con tres letras minúsculas en cursiva, que a menudo hacen referencia a su función aparente. Por ejemplo, los genes *dna*, *uvr* y *rec* están implicados en la replicación del *DNA*, la *r*esistencia a los efectos dañinos de la radiación UV y la *rec*ombinación, respectivamente. Cuando varios genes afectan al mismo proceso, se añaden las letras A, B, C, etc., como, por ejemplo, en *dna*A, *dna*B, *dna*Q que, generalmente, reflejan el orden en que han sido descubiertos, en lugar de la posición en una secuencia de reacciones. Hay convenciones similares para los genes eucarióticos, aunque la forma exacta de las abreviaturas puede variar con la especie, pues no existe una convención aplicable a todos los sistemas eucarióticos. Por ejemplo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los genes se nombran generalmente con tres letras mayúsculas seguidas de un número, y todo en cursiva (por ejemplo, el gen *COX1* codifica para una subunidad del citocromo oxidasa (Capítulo 19)). Los nombres de genes anteriores a las convenciones actuales pueden diferir en su formato «

El uso de abreviaturas para nombrar proteínas no es tan sencillo. En el curso de las investigaciones genéticas, a menudo se acaba aislando y caracterizando la proteína producto de cada gen. Se han identificado y nombrado muchos genes bacterianos antes de que las funciones de sus productos proteicos fuesen comprendidas en detalle. A veces, el producto génico resulta ser una proteína previamente aislada por lo que es necesario un cambio de nombre. A menudo, sin embargo, el producto resulta ser una proteína aún desconocida, con una actividad que no es fácilmente descrita por un nombre enzimático sencillo.

» **Convención clave:** Las proteínas bacterianas a menudo conservan el nombre de sus genes. Para designar el producto proteico de un gen de *E. coli* se usa letra redonda con la primera letra en mayúscula: por ejemplo, los productos de los genes *dna*A y *rec*A se denominan proteínas DnaA y RecA, respectivamente. La nomenclatura para las proteínas eucariotas es de nuevo compleja. En la levadura, algunas proteínas tienen nom-

bres largos y comunes (como citocromo oxidasa). Otras tienen el mismo nombre que el gen, en este caso el nombre de la proteína empieza en mayúscula y las dos siguientes letras están en minúscula, seguido por un número y la letra "p", todo en letra tipo roman (como Rad51p). La "p" es para enfatizar que es una proteína y evitar la confusión con la nomenclatura convencional de otros organismos. «

25.1 Replicación del DNA

Mucho antes de que se conociese la estructura del DNA, los científicos ya se habían preguntado sobre la capacidad de los organismos para crear copias fieles de sí mismos y, más tarde, sobre la capacidad de las células para producir muchas copias idénticas de macromoléculas grandes y complejas. La reflexión sobre estos problemas se centró en el concepto de **molde**, una estructura que haría posible alinear las moléculas en un orden específico y luego unirlas para crear una macromolécula con una estructura y una función únicas. En la década de 1940 se descubrió que el DNA era la molécula que almacenaba la información genética, pero no fue hasta que James Watson y Francis Crick dedujeron su estructura, que resultó claro de qué forma el DNA actuaba de molde para la replicación y la transmisión de la información genética: *cada una de las cadenas es complementaria de la otra*. Las estrictas reglas del apareamiento de bases hacen que cada cadena haga de molde para una nueva cadena, cuya secuencia es predecible y complementaria (véanse las Figs. 8-14, 8-15).

Las propiedades fundamentales de la replicación del DNA y de los mecanismos utilizados por los enzimas que la catalizan son básicamente idénticos en todos los organismos. Esta unidad mecanística será un tema fundamental cuando pasemos de las propiedades generales del proceso de replicación a los enzimas que lo catalizan en *E. coli* y, finalmente, a la replicación en eucariotas.

La replicación del DNA está gobernada por un conjunto de reglas fundamentales

Los primeros estudios sobre la replicación del DNA bacteriano y sus enzimas contribuyeron al establecimiento de varias propiedades básicas que son de aplicación a la síntesis del DNA de todos los organismos.

La replicación del DNA es semiconservadora Cada cadena del DNA actúa de molde para la síntesis de una nueva cadena. El resultado son dos moléculas de DNA nuevas, cada una con una cadena nueva y otra vieja. Este proceso se denomina **replicación semiconservadora.**

La hipótesis de la replicación semiconservadora fue propuesta por Watson y Crick poco después de la publicación de su artículo sobre la estructura del DNA en 1953; ésta teoría fue confirmada en 1957 mediante ingeniosos experimentos diseñados por Matthew Meselson y Franklin Stahl. Estos investigadores cultivaron células de *E. coli* durante muchas generaciones en un medio cuya única fuente de nitrógeno (NH_4Cl) contenía ^{15}N, el isótopo "pesado" del nitrógeno, en lugar del isótopo "ligero" normal y más abundante, el ^{14}N. El DNA aislado de estas células tenía una densidad alrededor de un 1% mayor que el [^{14}N]DNA normal **(Fig. 25-2a)**. Aunque la diferencia es pequeña, es posible separar la mezcla de [^{15}N]DNA pesado y [^{14}N]DNA ligero por equilibrio de sedimentación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Las células de *E. coli* cultivadas en medio con ^{15}N se transfirieron a un medio que contenía solamente el isótopo ^{14}N, donde se las dejó crecer hasta la duplicación de la población celular. El DNA aislado de esta primera generación de células formó una única banda en el gradiente de CsCl en una posición que indicaba que las moléculas de DNA de doble hélice de las células hijas eran híbridos que contenían una cadena nueva con ^{14}N y una cadena parental con ^{15}N (Fig. 25-2b).

Este resultado contradecía la replicación conservadora, una hipótesis alternativa según la cual una molécula de DNA de la progenie estaría formada por dos cadenas de DNA recién sintetizadas, mientras que la otra contendría las dos cadenas parentales; este mecanismo no daría moléculas de DNA híbridas en el experimento de Meselson y Stahl. La hipótesis de la replicación semiconservadora fue confirmada en la siguiente etapa del experimento (Fig. 25-2c). Se permitió que las células volviesen a doblar su número en el medio con ^{14}N. El DNA aislado de este segundo ciclo de replicación mostró *dos* bandas en el gradiente de densidad, una con

COPY-STATION

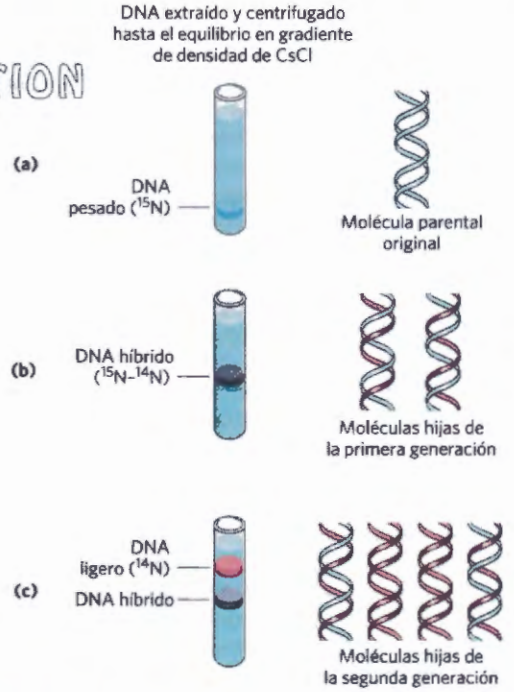


FIGURA 25-2 El experimento de Meselson-Stahl. **(a)** Se cultivaron células durante muchas generaciones en un medio que contenía sólo nitrógeno pesado, ^{15}N, de modo que todo el nitrógeno en el DNA era ^{15}N, tal como muestra la presencia de una única banda (azul) cuando el DNA fue centrifugado en un gradiente de densidad de CsCl. **(b)** Seguidamente, se transfirieron las células a un medio que sólo contenía nitrógeno ligero, ^{14}N. El DNA celular aislado después de la primera generación alcanzó el equilibrio en una posición superior del gradiente de CsCl (banda púrpura). **(c)** Un nuevo ciclo de replicación dio una banda de DNA híbrido (púrpura) y otra banda (roja), que solo contenía [^{14}N]DNA, confirmándose que la replicación era semiconservadora.

una densidad igual a la del DNA ligero mientras que la otra tenía la densidad del DNA híbrido observada después de la primera duplicación celular.

La replicación empieza en un origen y normalmente avanza de forma bidireccional Confirmado el mecanismo semiconservador de la replicación, se plantearon un buen número de preguntas. ¿Se desenrollan totalmente las cadenas de DNA parental antes de que cada una se replique? ¿Empieza la replicación en sitios al azar o en un único punto? ¿Después de iniciada la replicación en un punto del DNA, progresa en una dirección o en ambas?

Una indicación temprana de que la replicación era un proceso altamente coordinado, en el que las cadenas parentales se desenrollan y replican simultáneamente, fue obtenida por John Cairns mediante autorradiografía. Cairns incorporó radiactividad en el DNA de *E. coli*, cultivando las células en un medio que contenía timidina marcada con tritio (^{3}H). El DNA, cuidadosamente aislado y extendido, fue cubierto con una emulsión fotográfica durante varias semanas. La desintegración del ^{3}H de la timidina generó rastros de granos de plata de la emulsión, formando una imagen de la molécula de DNA. Estos rastros mostraron que el cromosoma intacto de *E. coli* es un gran círculo único de 1,7 mm de longitud. El DNA radiactivo aislado de células en proceso de replicación mostraba un lazo extra **(Fig. 25-3)**. Cairns llegó a la conclusión de que el lazo en el DNA era el resultado de la formación de dos cadenas hijas radiactivas, cada una complementaria de una cadena parental. Uno o ambos extremos del lazo son puntos dinámicos llamados **horquillas de replicación,** donde el DNA parental es desenrollado y las cadenas separadas rápidamente replicadas. Los resultados de Cairns demostraron que las dos cadenas del DNA se replican simultáneamente. Una variante de este experimento indicó que la replicación de los cromosomas bacterianos es bidireccional: los dos extremos del lazo tienen horquillas de replicación activas.

Para determinar si los lazos se originan en un único punto del DNA, se necesitaban señales de referencia a lo largo de la molécula de DNA. Estas señales fueron proporcionadas por una técnica denominada **cartografiado por desnaturalización**, desarrollada por Ross Inman y colaboradores. Utilizando el cromosoma del bacteriófago λ de 48.502 pb, Inman demostró que las secuencias del DNA ricas en pares de bases A=T pueden ser desnaturalizadas selectivamente. Las regiones desnaturalizadas forman un patrón reproducible de burbujas de cadena sencilla (véase la Fig. 8-28). De forma sinular se puede desnaturalizar parcialmente DNA que contenga bucles de replicación. Es posible medir la posición y el progreso de las horquillas de replicación utilizando las regiones desnaturalizadas como puntos de referencia. Esta técnica reveló que, en este sistema, los lazos de replicación siempre se inician en un punto único que se denominó **origen**. También confirmó observaciones anteriores que indicaban que la replicación es normalmente bidireccional. En las moléculas de DNA circular, las dos horquillas de replicación vuelven a encontrarse en un punto del círculo, en el lado opuesto al origen. Desde entonces se han identificado y caracterizado orígenes de replicación específicos en las bacterias y los eucariotas inferiores.

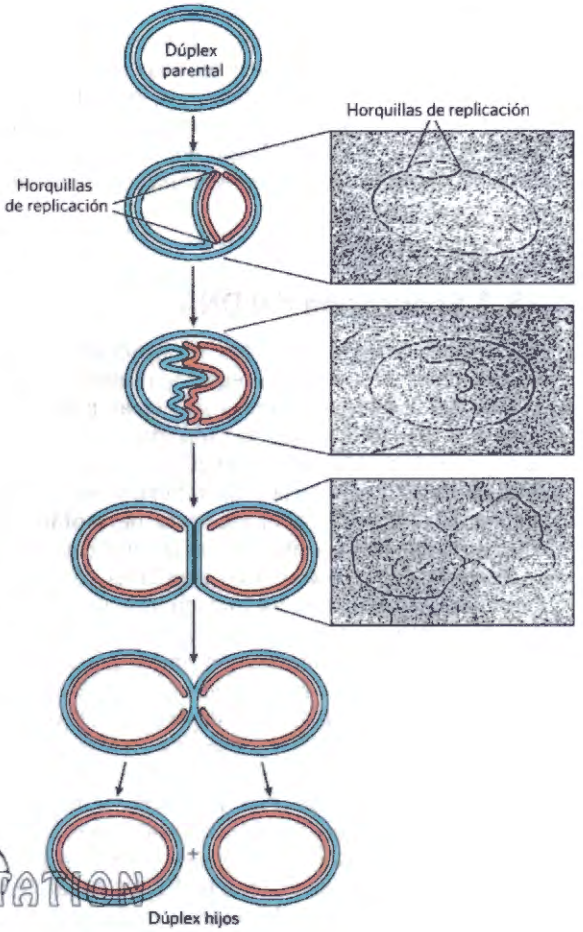


FIGURA 25-3 Visualización de la replicación del DNA. Etapas de la replicación de moléculas de DNA circulares visualizadas con el microscopio electrónico. La replicación de un cromosoma circular produce una estructura parecida a la letra griega teta, Θ, pues ambas cadenas se replican simultáneamente (las nuevas cadenas se muestran en rojo claro). Las micrografías electrónicas muestran imágenes del DNA plasmídico replicándose desde un único origen de replicación. [Fuente: Micrografías: J. Cairns, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 28:44, 1963]

La síntesis del DNA progresa en dirección 5'→3' y es semidiscontinua Las cadenas nuevas de DNA siempre se sintetizan en dirección 5'→3', siendo el 3'OH libre el punto de elongación del DNA (los extremos 5' y 3' de una cadena de DNA se definen en la Fig. 8-7). Debido a que las dos cadenas de DNA son antiparalelas, la cadena que actúa de molde se lee del extremo 3' al 5'.

Si la síntesis transcurre siempre en la dirección 5'→3', ¿cómo pueden sintetizarse las dos cadenas simultáneamente? Si las dos fuesen sintetizadas *continuamente* a medida que se desplaza la horquilla de replicación, una tendría que ser sintetizada en dirección 3'→ 5'. Este problema fue resuelto for Reiji Okazaki y colaboradores en la década de 1960. Okazaki descubrió que una de las cadenas nuevas de DNA se sintetiza en forma de trozos cortos, denominados **fragmentos de Okazaki**. Este trabajo condujo finalmente a la conclusión de que una de las cadenas es sintetizada de modo

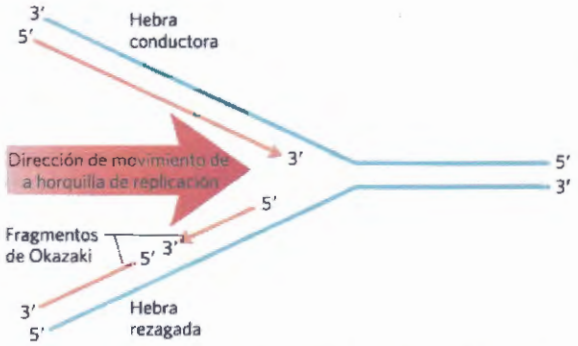


FIGURA 25-4 Identificación de las hebras del DNA en la horquilla de replicación. Una hebra nueva (rosa) de DNA se sintetiza siempre en dirección 5′→3′. El molde se lee en dirección opuesta 3′→5′. La hebra conductora se sintetiza ininterrumpidamente en la dirección seguida por la horquilla de replicación. La otra hebra, la hebra rezagada, se sintetiza de manera discontinua en trozos cortos (fragmentos de Okazaki) en dirección opuesta al desplazamiento de la horquilla de replicación. Los fragmentos de Okazaki son unidos a continuación por la DNA ligasa. En las bacterias, los fragmentos de Okazaki tienen una longitud de 1.000 a 2.000 nucleótidos. En las células eucarióticas, tienen de 150 a 200 nucleótidos.

continuo y la otra de modo discontinuo **(Fig. 25-4)**. La cadena continua o **hebra conductora** es aquella cuya síntesis en dirección 5′→3′ transcurre en la *misma* dirección que el movimiento de la horquilla de replicación. La cadena discontinua o **hebra rezagada** es aquella cuya síntesis en dirección 5′→3′ transcurre en dirección *opuesta* a la dirección del movimiento de la horquilla. Los fragmentos de Okazaki tienen típicamente de 100 a 200 nucleótidos de longitud en eucariotas, y de 1000 a 2000 nucleótidos de longitud en bacterias. Tal como veremos más adelante, las síntesis de la hebra conductora y de la hebra rezagada están estrechamente coordinadas.

El DNA es degradado por nucleasas

Para explicar la enzimología de la replicación del DNA, empezaremos con los enzimas que lo degradan, en vez de con aquellos que lo sintetizan. Estos enzimas se denominan **nucleasas** o **DNasas** si son específicas del DNA en lugar del RNA. Todas las células contienen varias nucleasas diferentes, que pueden clasificarse en dos amplias clases: exonucleasas y endonucleasas. Las **exonucleasas** degradan los ácidos nucleicos desde un extremo de la molécula. Muchas actúan sólo en dirección 5′→3′ o bien en dirección 3′→5′, eliminando nucleótidos sólo del extremo 5′ o del 3′, respectivamente, de una cadena de ácido nucleico de doble cadena o de un DNA de cadena sencilla. Las **endonucleasas** pueden empezar a degradar en puntos internos específicos de una cadena o molécula de ácido nucleico, reduciéndolo a fragmentos cada vez más pequeños. Unas pocas exonucleasas y endonucleasas degradan exclusivamente DNA de cadena sencilla. Hay unas pocas clases de endonucleasas de gran importancia que sólo cortan secuencias de nucleótidos específicas (por ejemplo, las endonucleasas de restricción, de tanta importancia en biotecnología; véase el Capítulo 9; Fig. 9-2). En este capítulo y en los que siguen se encontrarán muchos tipos de nucleasas.

El DNA es sintetizado por DNA polimerasas



Arthur Kornberg, 1918–2007 [Fuente: World History Archive/Alamy.]

La búsqueda de un enzima que pudiese sintetizar DNA empezó en 1955. El trabajo de Arthur Kornberg y colaboradores culminó en la purificación y caracterización de una DNA polimerasa de *E. coli*, un enzima con una sola cadena polipeptídica, conocido actualmente como **DNA polimerasa I** (M_r 103.000; codificada por el gen *pol*A). Mucho después, se encontraron en *E. coli* al menos otras cuatro DNA polimerasas distintas, descritas más adelante.

Los estudios detallados sobre la DNA polimerasa I revelaron características del proceso de síntesis del DNA que han resultado ser comunes a todas las DNA polimerasas. La reacción fundamental es una transferencia de grupo fosforilo. El nucleófilo es el grupo 3′ hidroxilo del nucleótido en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento. El ataque nucleofílico se produce sobre el fósforo α del desoxinucleósido 5′-trifosfato entrante **(Fig. 25-5a)**. En la reacción se libera pirofosfato inorgánico. La reacción general es

$$\underset{\text{DNA}}{(\text{dNMP})_n} + \text{dNTP} \rightarrow \underset{\substack{\text{DNA}\\ \text{alargado}}}{(\text{dNMP})_{n+1}} + \text{PP}_i \qquad (25\text{-}1)$$

donde dNMP y dNTP son desoxinucleósidos 5′-monofosfato y 5′-trifosfato, respectivamente. Hay que destacar que en la catálisis por prácticamente todas las DNA polimerasas participan dos iones Mg^{2+} del sitio activo (Fig. 25-5a). Uno de ellos contribuye a desprotonar el grupo 3′-hidroxilo convirtiéndolo en un nucleofilo más efectivo. El otro se une al dNTP entrante y facilita la salida del pirofosfato.

La reacción, aparentemente, tiene lugar con sólo un cambio mínimo de energía libre, puesto que se forma un enlace fosfodiéster a expensas de un anhídrido fosfórico, sólo algo menos estable. Sin embargo, las interacciones no covalentes de apilamiento y de apareamiento de bases estabilizan el producto DNA alargado en relación con el nucleótido libre. Además, en la célula la formación de productos está favorecida por los 19 kJ/mol generados por la posterior hidrólisis del pirofosfato por el enzima pirofosfatasa.

Los trabajos iniciales sobre la DNA polimerasa I definieron dos requerimientos básicos para la polimerización del DNA (Fig. 25-5). En primer lugar, todas las DNA polimerasas requieren un molde. La reacción de polimerización está dirigida por una cadena molde de DNA según las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick: donde hay una guanina en el molde se añade un desoxinucleótido de citosina a la nueva cadena, y así sucesivamente. Este fue un descubrimiento especialmente importante, no sólo porque proporcionó una base química para la replicación semiconservadora del DNA, sino también porque representó el primer ejemplo de utilización de un molde para guiar una reacción biosintética.

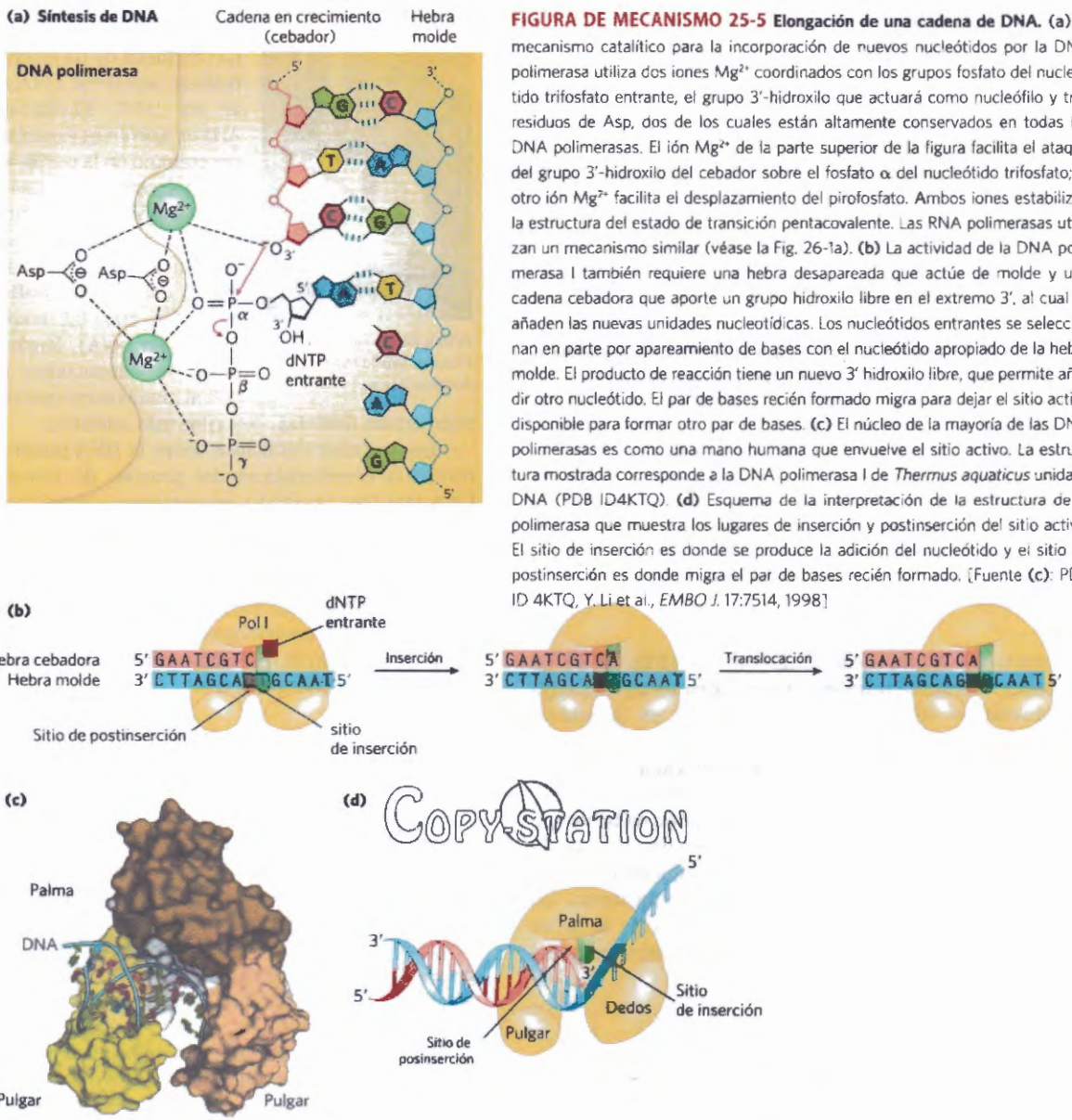


FIGURA DE MECANISMO 25-5 Elongación de una cadena de DNA. **(a)** El mecanismo catalítico para la incorporación de nuevos nucleótidos por la DNA polimerasa utiliza dos iones Mg^{2+} coordinados con los grupos fosfato del nucleótido trifosfato entrante, el grupo 3'-hidroxilo que actuará como nucleófilo y tres residuos de Asp, dos de los cuales están altamente conservados en todas las DNA polimerasas. El ión Mg^{2+} de la parte superior de la figura facilita el ataque del grupo 3'-hidroxilo del cebador sobre el fosfato α del nucleótido trifosfato; el otro ión Mg^{2+} facilita el desplazamiento del pirofosfato. Ambos iones estabilizan la estructura del estado de transición pentacovalente. Las RNA polimerasas utilizan un mecanismo similar (véase la Fig. 26-1a). **(b)** La actividad de la DNA polimerasa I también requiere una hebra desapareada que actúe de molde y una cadena cebadora que aporte un grupo hidroxilo libre en el extremo 3', al cual se añaden las nuevas unidades nucleotídicas. Los nucleótidos entrantes se seleccionan en parte por apareamiento de bases con el nucleótido apropiado de la hebra molde. El producto de reacción tiene un nuevo 3' hidroxilo libre, que permite añadir otro nucleótido. El par de bases recién formado migra para dejar el sitio activo disponible para formar otro par de bases. **(c)** El núcleo de la mayoría de las DNA polimerasas es como una mano humana que envuelve el sitio activo. La estructura mostrada corresponde a la DNA polimerasa I de *Thermus aquaticus* unida al DNA (PDB ID4KTQ). **(d)** Esquema de la interpretación de la estructura de la polimerasa que muestra los lugares de inserción y postinserción del sitio activo. El sitio de inserción es donde se produce la adición del nucleótido y el sitio de postinserción es donde migra el par de bases recién formado. [Fuente **(c)**: PDB ID 4KTQ, Y. Li et al., *EMBO J.* 17:7514, 1998.]

Segundo, las polimerasas requieren un **cebador**. Un cebador es un segmento de cadena (complementario del molde) con un grupo 3'-hidroxilo libre al cual pueden añadirse nucleótidos; el extremo 3' del cebador se denomina **extremo cebador**. Dicho de otro modo, parte de la cadena nueva ya tiene que encontrarse en su lugar; todas las DNA polimerasas, sin excepción, sólo son capaces de añadir nucleótidos a una cadena preexistente. Los cebadores son a menudo oligonucleótidos de RNA, en lugar de DNA; enzimas especializados sintetizan los cebadores dónde y cuándo son requeridos.

El sitio activo de una DNA polimerasa tiene dos partes (Fig. 25-5b). El nucleótido entrante se sitúa inicialmente en el **sitio de inserción**. Una vez formado el enlace fosfodiéster la polimerasa se desliza hacia delante sobre el DNA y un nuevo par de bases se sitúa en el **sitio de postinserción**. Estos elementos se encuentran en una cavidad que se parece a la palma de la mano (Fig. 25-5c).

Después de añadir un nucleótido a una cadena de DNA en crecimiento, la DNA polimerasa se disocia o bien se traslada a lo largo del molde y añade otro nucleótido. La disociación y la reasociación de la polimerasa pueden limitar la velocidad global de polimerización. El proceso es generalmente más rápido si la polimerasa añade nucleótidos sin disociarse del molde. El número medio de nucleótidos añadidos antes de que una polimerasa se disocie define su **procesividad**. Las DNA polimerasas muestran una gran variación en su procesividad; algunas sólo añaden unos pocos nucleótidos antes de disociarse, mientras que otras añaden muchos millares.

La replicación es muy precisa

La replicación tiene lugar con un grado extraordinario de fidelidad. En *E. coli*, sólo se comete un error por cada 10^9 o 10^{10} nucleótidos incorporados. Dado que el

cromosoma de *E. coli* tiene unos 4,6 x 10^6 pb, esto significa que se comete un error cada 1.000 a 10.000 replicaciones. Durante la polimerización, la discriminación entre nucleótidos correctos e incorrectos se basa no solamente en los puentes de hidrógeno que especifican el apareamiento correcto entre bases complementarias, sino también en la geometría común de los pares de bases estándar A=T y G≡C **(Fig. 25-6)**. El sitio activo de la DNA polimerasa I acomoda solamente pares de bases con esta geometría. Un nucleótido incorrecto puede ser capaz de formar puentes de hidrógeno con una base del molde, pero generalmente no encajará en el sitio activo. Las bases incorrectas pueden ser desechadas antes de que se forme el enlace fosfodiéster.

La precisión de la propia reacción de polimerización es, no obstante, insuficiente para explicar el elevado grado de fidelidad de la replicación. Cuidadosas medidas in vitro han demostrado que las DNA polimerasas insertan un nucleótido incorrecto por cada 10^4 a 10^5 correctos. Estos errores se cometen a veces porque una base se encuentra momentáneamente en una forma tautomérica infrecuente (véase la Fig. 8-9), que permite la formación de enlaces de hidrógeno con una base incorrecta. La tasa de error disminuye in vivo gracias a mecanismos enzimáticos adicionales.

Un mecanismo intrínseco de prácticamente todas las DNA polimerasas es una actividad exonucleasa 3'→5' independiente, que realiza una segunda comprobación de cada nucleótido una vez ha sido añadido. Esta actividad nucleasa permite eliminar un nucleótido recién incorporado y es altamente específica para pares de bases incorrectos **(Fig. 25-7)**. Si la polimerasa ha añadido un nucleótido incorrecto, se inhibe la translocación del enzima a la posición donde ha de incorporarse el siguiente nucleótido. Esta pausa cinética ofrece la oportunidad de una corrección. La actividad exonucleasa 3'→ 5' elimina el nucleótido mal apareado y la polimerasa vuelve a empezar. Esta actividad, denominada de **corrección de pruebas**, no es simplemente la inversa de la reacción de polimerización (Ec. 25-1), puesto que no interviene el pirofosfato. Las actividades de polimerización y de corrección de pruebas de una DNA polimerasa se pueden medir separadamente. La corrección de pruebas mejora la precisión inherente a la reacción de polimerización en un factor de 10^2 a 10^3. En la DNA polimerasa I monomérica, las actividades de polimerización y de corrección de pruebas tienen sitios activos separados en el mismo polipéptido.

Con la selección de bases y la corrección de pruebas combinadas, la DNA polimerasa deja tras de sí un error cada 10^6 a 10^8 bases añadidas. Sin embargo, la precisión observada en células de *E. coli* es todavía mayor. La precisión adicional se debe a un sistema enzimático separado que repara los pares de bases incorrectos que permanecen después de la replicación. Este proceso de reparación de apareamientos incorrectos, se describe, junto con otros procesos de reparación del DNA, en la Sección 25.2.

E. coli posee al menos cinco DNA polimerasas

Más del 90% de la actividad DNA polimerasa observada en los extractos de *E. coli* se debe a la DNA polimerasa I. No obstante, poco después de su aislamiento en 1955, se empezaron a acumular pruebas de que este enzima no es adecuado para la replicación del gran cromosoma de *E. coli*. Primero, la velocidad a la que adiciona

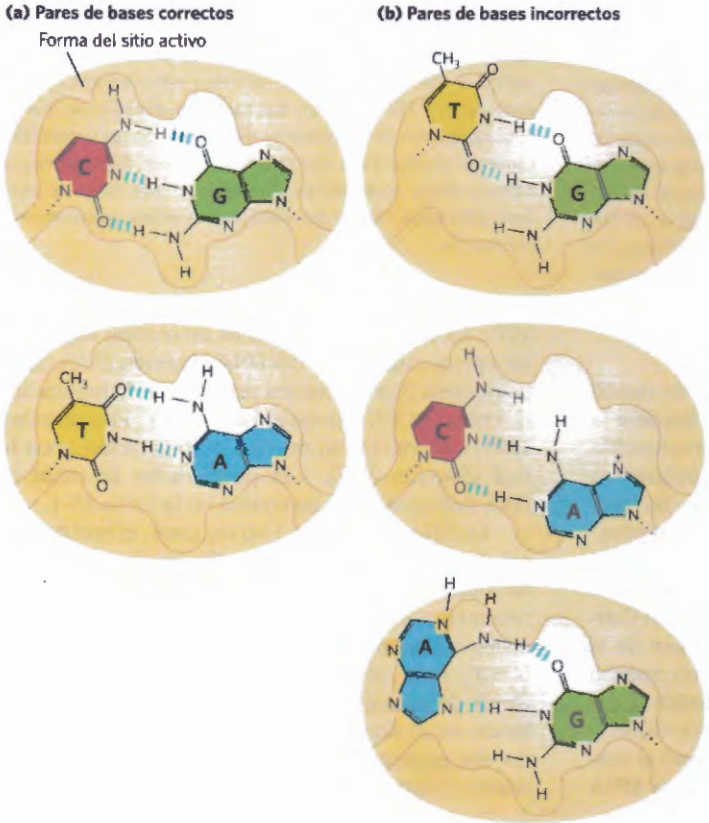


FIGURA 25-6 Contribución de la geometría de los pares de bases a la fidelidad de la replicación del DNA. **(a)** Los pares de bases estándar A=T y G≡C tienen geometrías muy similares y un sitio de unión capaz de acomodar uno de ellos generalmente acomodará el otro. **(b)** La geometría de los pares de bases incorrectos puede excluirlos del sitio activo, tal como sucede con la DNA polimerasa.

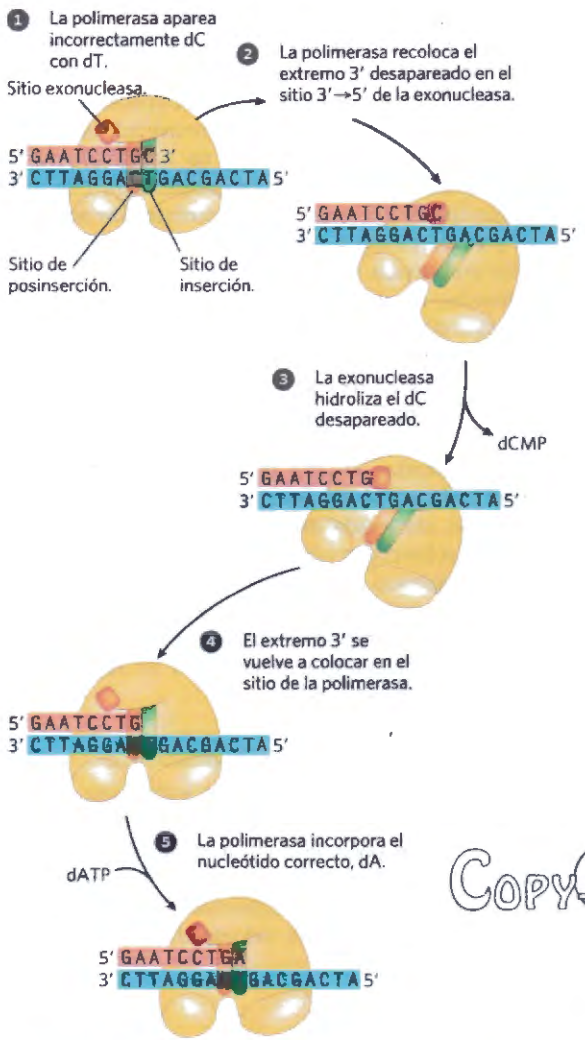


FIGURA 25-7 Ejemplo de corrección de errores por la actividad exonucleasa 3'*5' de la DNA polimerasa I. El análisis estructural ha localizado la actividad exonucleasa por detrás de la actividad polimerasa tal como está orientado el enzima en su movimiento a lo largo del DNA. Una base mal apareada (en este caso, un apareamiento incorrecto C-T) impide la translocación de la DNA polimerasa I al sitio siguiente. El DNA unido al enzima se desliza hacia atrás al sitio de la exonucleasa y el enzima corrige el error con su actividad exonucleasa 3'→5'. A continuación, el enzima reemprende su actividad polimerasa en la dirección 5'→3'.

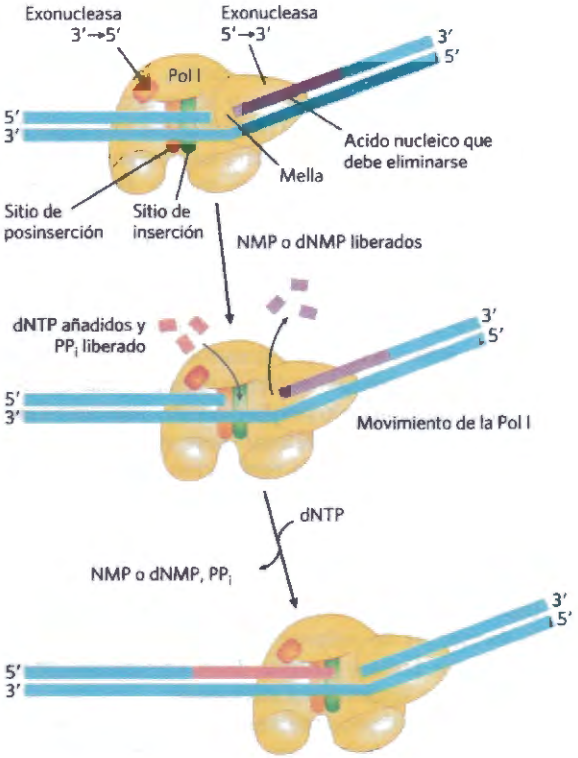


FIGURA 25-8 Traslado de la mella. La DNA polimerasa I bacteriana tiene tres dominios que catalizan sus actividades DNA polimerasa, 5'→3' exonucleasa y 3'→5' exonucleasa. El dominio 5'→3' exonucleasa se encuentra en la parte anterior del enzima en el sentido del avance a lo largo del DNA y no se muestra en la Figura 25-5. Al degradar la hebra del DNA por delante del enzima y sintetizar una nueva hebra detrás, la DNA polimerasa I puede llevar a término una reacción denominada translado de la mella, en la cual una rotura o una mella en el DNA se desplaza junto con el enzima. Este proceso tiene una función en la reparación del DNA y en la eliminación de los cebadores de RNA durante la replicación (los dos procesos se describen más adelante). La hebra de ácido nucleico (DNA o RNA) que ha de ser eliminada se muestra en púrpura, la hebra de reemplazo se muestra en rojo. La síntesis de DNA comienza en una mella (un enlace fosfodiéster roto que deja un 3' hidroxilo libre y un fosfato en 5' libre). En el sitio donde se disocia la DNA polimerasa I queda una mella, que es sellada posteriormente por otro enzima.

COPY-STATION

nucleótidos (600 nucleótidos añadidos/min) es demasiado lenta (en un factor de 100 o más) para explicar la velocidad del movimiento de la horquilla de replicación en las células bacterianas. Segundo, la DNA polimerasa I tiene una procesividad relativamente baja. Tercero, estudios genéticos han demostrado que en la replicación intervienen muchos genes y, por tanto, muchas proteínas: claramente la DNA polimerasa I no actúa aisladamente. Cuarto, y de gran importancia, John Cairns aisló en 1969 una cepa bacteriana con el gen de la DNA polimerasa I alterado, que producía un enzima inactivo. Esta cepa era anormalmente sensible a los agentes que dañaban al DNA, no obstante, era viable.

La búsqueda de otras DNA polimerasas llevó al descubrimiento de la **DNA polimerasa II** y de la **DNA polimerasa III** en *E. coli* a principios de la década de 1970. La DNA polimerasa II es un enzima implicado en un tipo de reparación del DNA (Sección 25.3). La DNA polimerasa III es el enzima principal de la replicación en *E. coli*. Las DNA polimerasas IV y V, identificadas en 1999, intervienen en un tipo de reparación poco habitual (Sección 25.2). *Las* propiedades de estas cinco DNA polimerasas se comparan en la Tabla 25-1.

La DNA polimerasa I no es, pues, el enzima principal de la replicación; en cambio, realiza una multitud de funciones de limpieza durante la replicación, la recombinación y la reparación. Estas funciones especiales están potenciadas por su actividad exonucleasa 5'→3'. Esta actividad, diferente de la exonucleasa 3'→5' de corrección de pruebas (Fig. 25-7), está localizada en un dominio estructural que puede ser separado del enzima mediante un tratamiento proteolítico suave. Cuando se elimina el dominio exonucleasa

TABLA 25-1 Comparación de las tres DNA polimerasas de *E. coli*

	DNA polimerasa				
	I	II[a]	III	IV[a]	V[a]
Gen estructural[b]	*polA*	*polB*	*polC* (*dnaE*)	*dinB*	*umuC*
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	9	1	3
M_r	103.000	88,000[c]	1.065.400	39.100	110.000
Exonucleasa 3'→5' (correctora de pruebas)	Sí	Sí	Sí	No	No
Exonucleasa 5'→3'	Sí	No	No	No	No
Velocidad de polimerización (nucleótidos/s)	10–20	40	250–1.000	2–3	1
Procesividad (nucleótidos añadidos antes de la disociación de la polimerasa)	3–200	1,500	≥500.000	1	6–8

[a]DNA polimerasa para la síntesis de translesión. Para DNA polimerasa IV, la procesividad aumenta substancialmente al asociarse con la abrazadera β. Esta polimerasa se ralentiza cuando la cadena molde de DNA presenta una lesión.

[b]Para los enzimas con más de una subunidad, el gen citado codifica la subunidad con actividad polimerizante. Obsérvese que *dnaE* es una designación anterior del gen denominado actualmente *polC*.

[c]Se refiere solamente a la subunidad polimerizante. La DNA polimerasa II comparte varias subunidades con la DNA polimerasa III, entre ellas las subunidades β, γ, δ, δ', χ y ψ (véase la Tabla 25-2).

5'→3', el fragmento restante (M_r 68.000), denominado **fragmento grande** o de **Klenow**, retiene las actividades de polimerización y de corrección de pruebas. La actividad exonucleasa 5'→3' de la DNA polimerasa I intacta es capaz de reemplazar un segmento de DNA (o RNA) apareado a la hebra molde, en un proceso denominado translación de la mella **(Fig. 25-8)**. La mayoría de las restantes DNA polimerasas carecen de actividad exonucleasa 5'→3'.

La DNA polimerasa III es mucho más compleja que la DNA polimerasa I, con 9 clases distintas de subunidades (Tabla 25-2). Sus actividades de polimerización y de corrección de pruebas residen en las subunidades α y ε (épsilon), respectivamente. La subunidad θ se asocia con las subunidades α y ε para formar la polimerasa núcleo, capaz de polimerizar el DNA, pero de procesividad limitada. Dos polimerasas núcleo se pueden unir mediante otro conjunto de subunidades, un complejo de carga de la abrazadera, o complejo γ, consistente en cinco subunidades de tres tipos diferentes, $\tau_3\gamma\delta\delta'$. Las polimerasas núcleo se unen a través de las subunidades τ (tau). Dos subunidades adicionales, χ (chi) y ψ (psi), están unidas al complejo de carga de la abrazadera. El conjunto completo de 16 subunidades (de ocho tipos diferentes) se denomina DNA polimerasa III* **(Fig. 25-9a)**.

La DNA polimerasa III* puede polimerizar DNA, pero con una procesividad mucho menor que la necesaria para replicar el cromosoma completo. El necesario aumento de procesividad resulta de la unión de las subunidades β. Las subunidades β se asocian por pares para formar una estructura toroidal que rodea al DNA y que actúa como una abrazadera (Fig. 25-9b). Cada dímero se asocia con un núcleo de polimerasa III (una abrazadera dimérica por núcleo) y se desliza a lo largo del DNA a medida que avanza la replicación. La abrazadera β deslizante impide la disociación de la DNA polimerasa III del DNA, lo cual aumenta la procesividad en un factor de más de 500.000 (Tabla 25-1). La adición de las subunidades β convierten la DNA polimerasa III* en el holoenzima de DNA polimerasa III.

La replicación del DNA requiere muchos enzimas y factores proteicos

La replicación en *E. coli* necesita no sólo una DNA polimerasa, sino también 20 o más enzimas y proteínas diferentes, cada una con una tarea específica. El conjunto se ha denominado **sistema DNA replicasa** o **replisoma**. La complejidad enzimática de la replicación refleja los requerimientos impuestos por la estructura del DNA y las exigencias de fidelidad. Trataremos las clases principales de enzimas de la replicación desde el punto de vista de las tareas que tienen que afrontar.

El acceso a las cadenas de DNA que han de actuar de molde requiere la separación de las dos cadenas parentales. Esta tarea corre a cargo generalmente de enzimas denominados **helicasas**, que se desplazan a lo largo del DNA y separan las cadenas utilizando la energía química del ATP. La separación de las cadenas crea una tensión topológica en la estructura helicoidal del DNA (véase la Fig. 24-11), que es relajada por la acción de **topoisomerasas**. Las cadenas separadas son estabilizadas por **proteínas de unión al DNA**. Como se ha mencionado anteriormente, los cebadores, segmentos cortos de RNA sintetizados por enzimas denominados **primasas**, han de estar unidos al molde antes de que las DNA polimerasas puedan empezar la síntesis. Posteriormente, los cebadores de RNA son eliminados y reemplazados por DNA. En *E. coli*, ésta es una de las muchas funciones de la DNA polimerasa I. Después de la eliminación del cebador de RNA y del relleno del hueco con DNA, queda una mella en la cadena azúcar-fosfato, en forma de un enlace fosfodiéster roto. Estas mellas son selladas por enzimas denominados **DNA ligasas**. Todos estos procesos han de estar coordinados y regulados. *E. coli* es el sistema donde las interconexiones entre los diferentes componentes han sido mejor caracterizadas.

TABLA 25-2 Subunidades de la DNA polimerasa III de *E. coli*

Subunidad	Número de subunidades por holoenzima I	M_r de la subunidad	Gen	Función de la subunidad	
α	3	129.900	*polC* (*dnaE*)	Actividad polimerizante	Polimerasa núcleo
ε	3	27.500	*dnaQ* (*mutD*)	Actividad exonucleasa 3'→5' de corrección de pruebas	
θ	3	8.600	*holE*	Estabilización de la subunidad ε	
τ	3	71.100	*dnaX*	Unión estable del molde; dimerización del enzima núcleo	Complejo de carga de la abrazadera (γ) que carga las subunidades β en la hebra rezagada en cada fragmento de Okazaki[a]
δ	1	38.700	*holA*	Abridor de la abrazadera	
δ'	1	36.900	*holB*	Cargador de la abrazadera	
χ	1	16.600	*holC*	Interacción con SSB	
ψ	1	15.200	*holD*	Interacción con y subunidades τ y χ	
β	6	40.600	*dnaN*	Abrazadera del DNA necesaria para una procesividad óptima	

[a] El Complejo de carga de la abrazadera también se denomina complejo γ, por la existencia de otra versión del complejo en el cual tres subunidades, llamadas γ reemplazan las subunidades τ. La subunidad γ está codificada por una porción del gen de la subunidad τ (dna X), de modo que el 66% del amino-terminal de la subunidad τ tiene la misma secuencia de aminoácidos que la subunidad γ. La subunidad γ es generada por un mecanismo de desplazamiento del marco de lectura de la traducción (véase la p. 1085) que provoca la finalización prematura de la traducción.

La subunidad γ comparte las funciones de la abrazadera de carga, pero carece del fragmento de proteína que interacciona con el nucleo de la polimerasa o con la DnaB helicasa.

El Complejo de carga de la abrazadera que ha incorporado las subunidades γ puede funcionar independiente del holoenzima de la DNA polimerasa III, promoviendo la descarga de la abrazadera β descartada de la cadena rezagada mientras la horquilla de replicación avanza. También pueden promover la carga de la abrazadera β en los procesos de reparación del DNA que requieren de la síntesis de DNA lejos de la horquilla de replicación.

COPYSTATION

La replicación del cromosoma de *E. coli* procede por etapas

La síntesis de una molécula de DNA se puede dividir en tres fases: iniciación, elongación y terminación. Estas fases se distinguen por las reacciones que tienen lugar y por los enzimas implicados. Como veremos en éste y en los dos capítulos siguientes, la síntesis de los principales biopolímeros que contienen información, DNA, RNA y proteínas, se puede entender también en térmi-

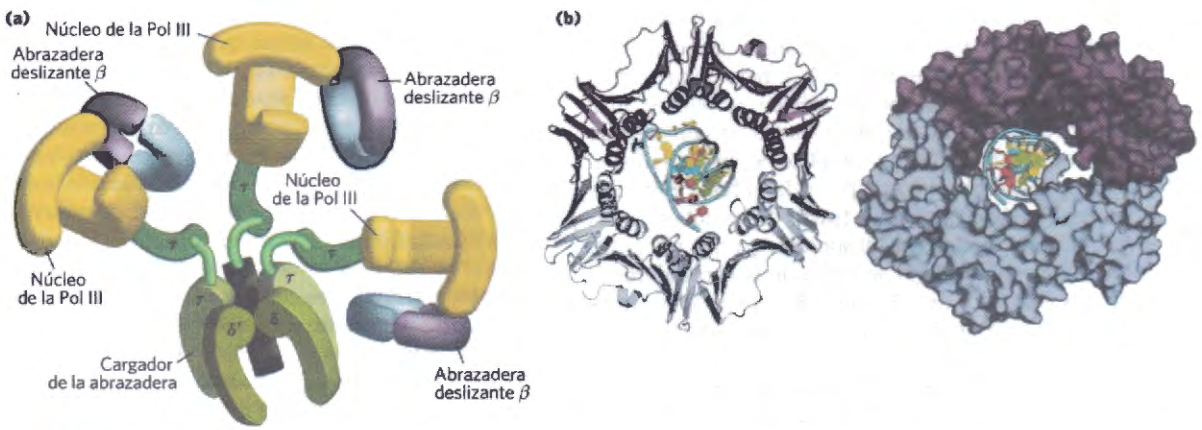


FIGURA 25-9 DNA polimerasa III. (a) Arquitectura de la DNA polimerasa III bacteriana (Pol III). Los tres dominios núcleo, compuestos de las subunidades α, ε, y θ, están unidos por un complejo de carga de la abrazadera de cinco subunidades (también llamado complejo γ; el termino esta explicado en el pie de nota de la tabla 25-2) cuya composición es $\tau_3\delta\delta'$. Las subunidades núcleo y el complejo de carga de la abrazadera forman la DNA polimerasa III*. Las otras dos subunidades de la DNA polimerasa III*, χ y ψ (no mostradas), también se unen al complejo de carga de la abrazadera. Tres abrazaderas β interaccionan con los tres subconjuntos núcleo, siendo cada una de las abrazaderas un dímero de la subunidad β. El complejo interacciona con la DnaB helicasa (descrita más adelante en el texto) a través de las subunidades τ. **(b)** Dos subunidades β de la polimerasa III de *E. coli* forman una abrazadera circular que rodea el DNA. La abrazadera se desliza a lo largo de La molécula de DNA, aumentando la procesividad del holoenzima de la polimerasa III en más de 500.000 nucleótidos al impedir su disociación de DNA. Las dos subunidades β se muestran en dos tonos de púrpura en forma de estructura de cintas (izquierda) e imágenes de superficie (derecha), rodeando el DNA (adaptado de PDB ID 2POL). [Fuente: **(a)** Información extraída de N. Yao and M. O'Donnell, *Mol. Biosyst.* 4:1075, 2008. **(b)** PDB ID 2POL, X.-P. Kong et al. *Cell* 69:425, 1992]

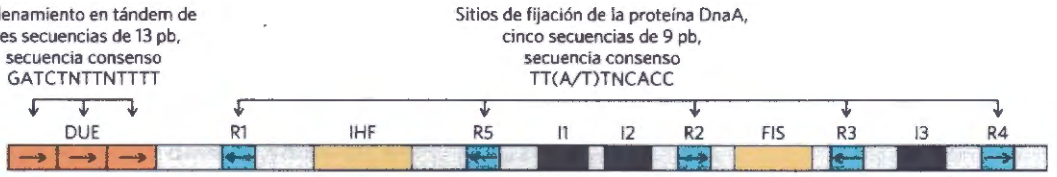


FIGURA 25-10 Ordenamiento de las secuencias en el origen de replicación *oriC* de *E. coli*. Se muestran las secuencias consenso (véase la p. 104) de los elementos repetidos principales. N representa cualquiera de los cuatro nucleótidos. Las flechas horizontales indican la orientación de las secuencias nucleotídicas (la flecha de izquierda a derecha indica la secuencia de la hebra superior; la de derecha a izquierda, la hebra inferior). FIS e IHF son sitios de unión para proteínas descritas en el texto. DnaA se une a los sitios R. Los sitios I son sitios de unión adicionales (de diferente secuencia) de DnaA, a los que se une DnaA sólo cuando la proteína forma complejo con el ATP.

nos de las tres mismas fases, cada una con sus características peculiares. Los procesos que se describen a continuación reflejan la información obtenida de experimentos in vitro, utilizando proteínas purificadas de *E. coli*, aunque todos los sistemas de replicación comparten los mismos principios básicos.

Iniciación El origen de la replicación de *E. coli*, *oriC*, consta de 245 pb, que contienen secuencias de DNA muy conservadas entre los orígenes de replicación bacterianos. La posición general de las secuencias conservadas se ilustra en la **Figura 25-10**. Hay dos tipos de secuencias de especial interés: cinco repeticiones de una secuencia de 9 pb (sitios R), que actúan de sitios de unión para la proteína de iniciación DnaA, y una región rica en pares de bases A=T denominada **elemento de desenrollamiento del DNA (DUE)**. Hay tres sitios de unión adicionales de DnaA (sitios I) y sitios de unión para las proteínas IHF (factor de integración del huésped) y FIS (factor de estimulación de la inversión). Estas dos proteínas fueron descubiertas como componentes necesarios para ciertas reacciones de recombinación descritas más adelante en este capítulo y sus nombres son reflejo de sus funciones. Otra proteína de unión al DNA, HU (una proteína bacteriana del tipo de las histonas, originalmente denominada factor U), también participa pero no tiene un sitio específico de unión.

En la fase de iniciación de la replicación participan al menos 10 enzimas o proteínas diferentes (incluidos en la Tabla 25-3). Estas se encargan de abrir la hélice del DNA en el origen y establecen un complejo precebador para las reacciones posteriores. El componente clave en el proceso de iniciación es la proteína DnaA, miembro de la familia proteica de las **AAA + ATPasa** (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares). Muchas AAA + ATPasas, incluida la DnaA, forman oligómeros e hidrolizan ATP de forma relativamente lenta. La hidrólisis de ATP actúa como un interruptor para la interconversión de la proteína entre dos estados. En el caso de la DnaA, la forma con ATP unido es activa mientras que la forma con ADP unido es inactiva.

Ocho proteínas DnaA, todas en el estado de ATP unido, se unen para formar un complejo helicoidal que abarca los sitios R e I en *oriC* **(Fig. 25-11)**. La DnaA tiene mayor afinidad por los sitios R que por los sitios I, y se une con la misma afinidad a los sitios R tanto con ATP o con ADP unido. Los sitios I, que unen solamente la forma de DnaA con ATP unido, permiten la discriminación entre las formas activa e inactiva de DnaA. El enrollamiento apretado hacia la derecha alrededor de este complejo introduce un superenrollamiento positivo

TABLA 25-3 Proteínas requeridas para iniciar la replicación en el origen de *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Función
Proteína DnaA	52.000	1	Reconoce la secuencia ori; abre el dúplex en sitios específicos del origen
Proteína DnaB (helicasa)	300.000	6[a]	Desenrolla el DNA
Proteína DnaC	174.000	6[a]	Requerida para la unión de DnaB en el origen
HU	19.000	2	Proteína tipo histona; proteína de unión al DNA; estimula la iniciación
FIS	22.500	2[a]	Proteína de unión al DNA; estimula la iniciación
IHF	22.000	2	Proteína de unión al DNA; estimula la iniciación
Primasa (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza cebadores de RNA
Proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB)	75.600	4[a]	Se une al DNA de cadena sencilla
DNA girasa (DNA topoisomerasa II)	400.000	4	Libera la tensión torsional generada por el desenrollamiento del DNA
Dam metilasa	32.000	1	Metila secuencias (5')GATC en *oriC*

[a]En estos casos las subunidades son idénticas.

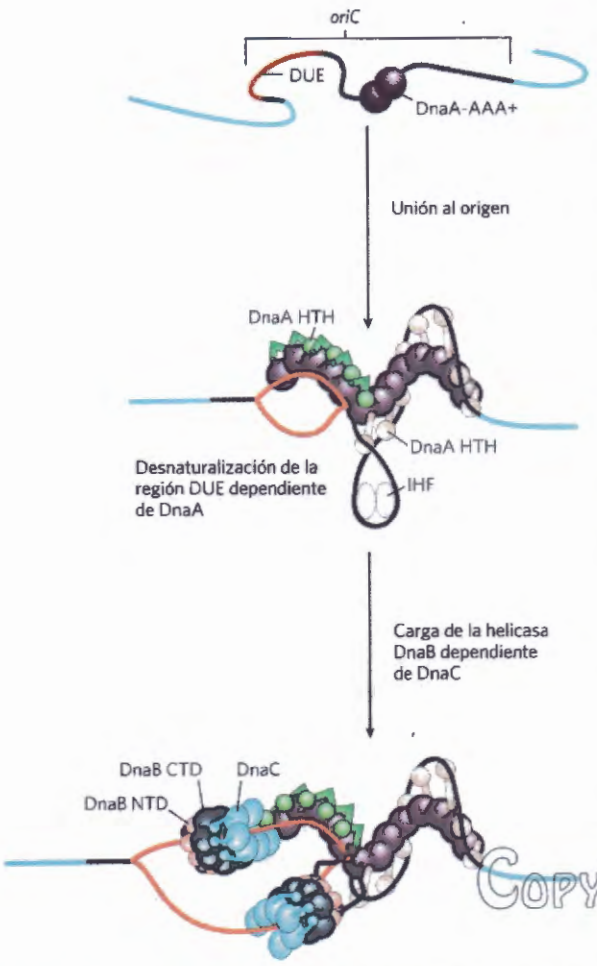


FIGURA 25-11 Modelo del inicio de la replicación en el origen *oriC* de *E. coli*. Ocho moléculas de proteína DnaA, cada una de ellas con un ATP ligado, se unen a los sitios R e I en el origen (véase la Fig. 25-10). El DNA está enrollado alrededor de este complejo, formando una estructura helicoidal dextrógira. La región DUE rica en A=T se desnaturaliza a consecuencia de la tensión generada por la unión adyacente de DnaA. La formación del complejo helicoidal de DnaA está facilitada por las proteínas HU, IHF y FIS, que no se muestran en la figura porque sus papeles estructurales todavía no están bien definidos. Hexámeros de proteína DnaB se unen a cada hebra con ayuda de la proteína DnaC. La actividad helicasa de la DnaB desenrolla todavía más al DNA como preparación para el cebado y la síntesis de DNA. [Fuente: Información de J. P. Erzberger et al Nature Struct. Mol. Biol. 13:676, 2006.]

efectivo (véase el Capítulo 24). La tensión producida en el DNA cercano, combinada con la unión de una proteína DnaA adicional a la región DUE, provoca la desnaturalización de esta región DUE rica en A=T. El complejo formado en el origen de replicación contiene otras proteínas de unión al DNA (HU, IHF y FIS), que facilitan la curvatura del DNA.

A continuación, la proteína DnaC, otra AAA + ATPasa, une la proteína DnaB a las hebras separadas del DNA de la región desnaturalizada. Un hexámero de DnaC, con ATP unido a cada una de sus subunidades, forma un complejo apretado con DnaB, la helicasa hexamérica y en forma de anillo. La interacción DnaC-DnaB abre el anillo de DnaB, proceso que se ve facilitado por la interacción entre DnaB y DnaA. Dos de los hexámeros en forma de anillo de DnaB se asocian a DUE, uno a cada cadena de DNA. El ATP unido a DnaC se hidroliza, liberando DnaC y dejando DnaB unida al DNA.

La carga de la helicasa DnaB es el paso clave de la iniciación de la replicación. Como se trata de una helicasa replicativa, la DnaB migra a lo largo del DNA de cadena sencilla en dirección 5'→ 3', desenrollando el DNA a medida que avanza. Las helicasas DnaB de las dos cadenas del DNA viajan por tanto en direcciones opuestas con lo que crean dos horquillas de replicación potenciales. Todas las demás proteínas de la horquilla de replicación están unidas directa o indirectamente a DnaB. La DNA polimerasa III holoenzima se une a través de las subunidades τ; otras interacciones adicionales de la DnaB se describen más adelante. Cuando empieza la replicación y se separan las hebras del DNA en la horquilla, muchas moléculas de proteína de unión al DNA de cadena sencilla (SSB) se unen y estabilizan las hebras separadas, mientras que la DNA girasa (topoisomerasa II) alivia la tensión topológica creada más allá de la horquilla por la reacción de desenrollamiento.

La iniciación es la única fase de la replicación del DNA que está regulada, para que sólo tenga lugar una vez en cada ciclo celular. No se conoce con exactitud el mecanismo de regulación, aunque estudios bioquímicos y genéticos han proporcionado indicaciones sobre diversos mecanismos de regulación independientes.

Una vez que la DNA polimerasa III se ha unido al DNA, junto con las subunidades β (que indica la finalización de la fase de iniciación), la proteína Hda se une a las subunidades β e interacciona con la DnaA para estimular la hidrólisis del ATP unido. La Hda es otra AAA + ATPasa estrechamente relacionada con la DnaA (su nombre deriva de *h*omóloga de *D*naA). La hidrólisis del ATP provoca el desmantelamiento del complejo DnaA en el origen. La lenta liberación del ADP por la DnaA y de nuevo la unión de ATP hace circular la proteína entre sus formas inactiva (con ADP unido) y activa (con ATP unido) en una escala temporal de 20 a 40 minutos.

El momento del inició de la replicación está afectado por la metilación del DNA y por interacciones con la membrana plasmática bacteriana. El DNA de *oriC* es metilado por la Dam metilasa (Tabla 25-3), que metila la adenina en N^6 dentro del palíndromo (5')GATC. (Dam se refiere a la *m*etilación de la *a*denina del *DNA*). La región *oriC* de *E. coli* está enriquecida en secuencias GATC, de las que hay 11 dentro de sus 245 pb, mientras que la frecuencia promedio de GATC en el cromosoma de *E. coli* es de 1 cada 256 pb.

Inmediatamente después de la replicación, el DNA es semimetilado: las hebras parentales tienen las secuencias *oriC* metiladas, mientras que las hebras de nueva síntesis no lo están. Las secuencias *oriC* semimetiladas son secuestradas temporalmente a través de la interacción con la membrana plasmática (el mecanismo es desconocido) y por unión de la proteína SeqA. Al cabo de un tiempo, se libera *oriC* de la membrana plasmática, y tiene que metilarse completamente por la Dam metilasa antes de que pueda unirse de nuevo a DnaA e iniciar un nuevo ciclo de replicación.

Elongación La fase de elongación en la replicación consiste en dos operaciones distintas, pero relacionadas: la síntesis de la hebra conductora y la síntesis de la hebra

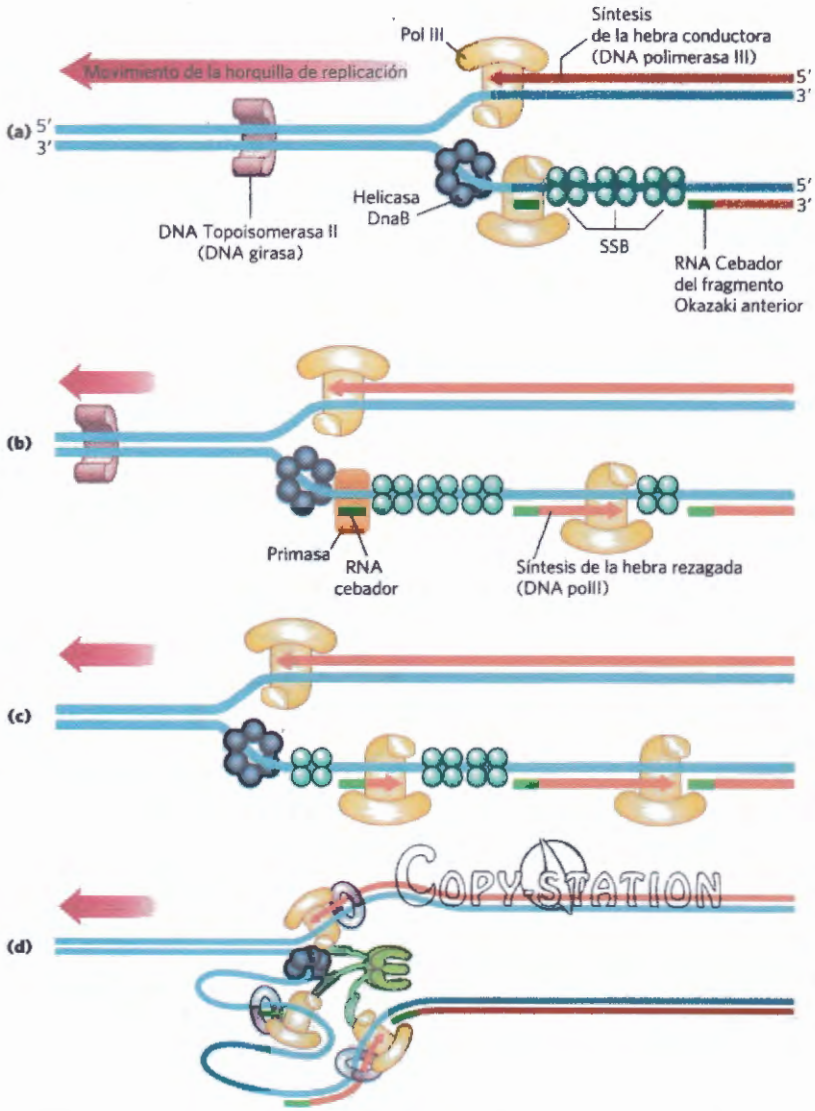


FIGURA 25-12 Síntesis de fragmentos de Okazaki. (a) A intervalos, la primasa sintetiza un cebador de RNA para un nuevo fragmento de Okazaki. Obsérvese que si suponemos que las dos hebras molde están dispuestas una al lado de la otra, la síntesis de la hebra rezagada transcurre en dirección opuesta al movimiento de la horquilla. **(b)** Cada cebador es alargado por la DNA polimerasa III. **(c)** La síntesis de DNA continúa hasta que el fragmento se extiende hasta el cebador del fragmento de Okazaki anterior. Se sintetiza un nuevo cebador cerca de la horquilla de replicación para empezar de nuevo el proceso. **(d)** Cada holoenzima de DNA polimerasa III presenta 3 conjuntos de subunidades núcleo, así uno o dos fragmentos Okazaki pueden ser sintetizados simultáneamente, a lo largo de la hebra conductora.

rezagada. En la síntesis de ambas cadenas son importantes varios enzimas que se encuentran en la horquilla de replicación. El DNA parental es primero desenrollado por DNA helicasas y la tensión topológica resultante es liberada por las topoisomerasas. Las SSB estabilizan a continuación cada una de las cadenas separadas. A partir de este punto, los procesos de síntesis de la hebra conductora y de la hebra rezagada difieren radicalmente.

La síntesis de la hebra conductora, la más sencilla de las dos, empieza con la síntesis de un cebador corto (10 a 60 nucleótidos) de RNA por la primasa (proteína DnaG) en el origen de replicación. La DnaG interacciona con la helicasa DnaB para llevar cabo esta reacción y el cebador es sintetizado en dirección opuesta a la del movimiento de la helicasa DnaB. En efecto, la helicasa DnaB se desplaza a lo largo de la hebra que se convierte en la hebra rezagada durante la síntesis del DNA; sin embargo, el primer cebador depositado en la primera interacción DnaG-DnaB sirve para cebar la síntesis de la hebra conductora en dirección opuesta. Los desoxirribonucleótidos son añadidos a este cebador por un complejo de DNA polimerasa III unida a la helicasa DnaB anclada en la hebra opuesta. Una vez iniciada, la síntesis de la hebra conductora transcurre de manera continua, al mismo ritmo que el desenrollamiento del DNA en la horquilla de replicación.

La síntesis de la hebra rezagada, como ya hemos indicado, se realiza a trozos de corta longitud, los fragmentos de Okazaki **(Fig. 25-12a)**. Primero, la primasa sintetiza un cebador de RNA y, como en la síntesis de la hebra conductora, la DNA polimerasa III se une al cebador de RNA y añade desoxirribonucleótidos (Fig. 25-12b). Hasta aquí, la síntesis de los fragmentos de Okazaki parece sencilla, pero en realidad es muy compleja. La complejidad reside en la *coordinación* de la síntesis de la hebra conductora y de la hebra rezagada. Ambas hebras son producidas por un único dímero asimétrico de DNA polimerasa III. Para ello la hebra rezagada forma un lazo, tal como se muestra en la **Figura 25-13**, que aproxima los dos puntos de polimerización.

La síntesis de los fragmentos de Okazaki en la hebra rezagada pone en juego complejas actividades enzimáticas. La helicasa DnaB y la primasa DnaG constituyen una unidad funcional dentro del complejo de replicación, denominado **primosoma**. La DNA polimerasa III usa un

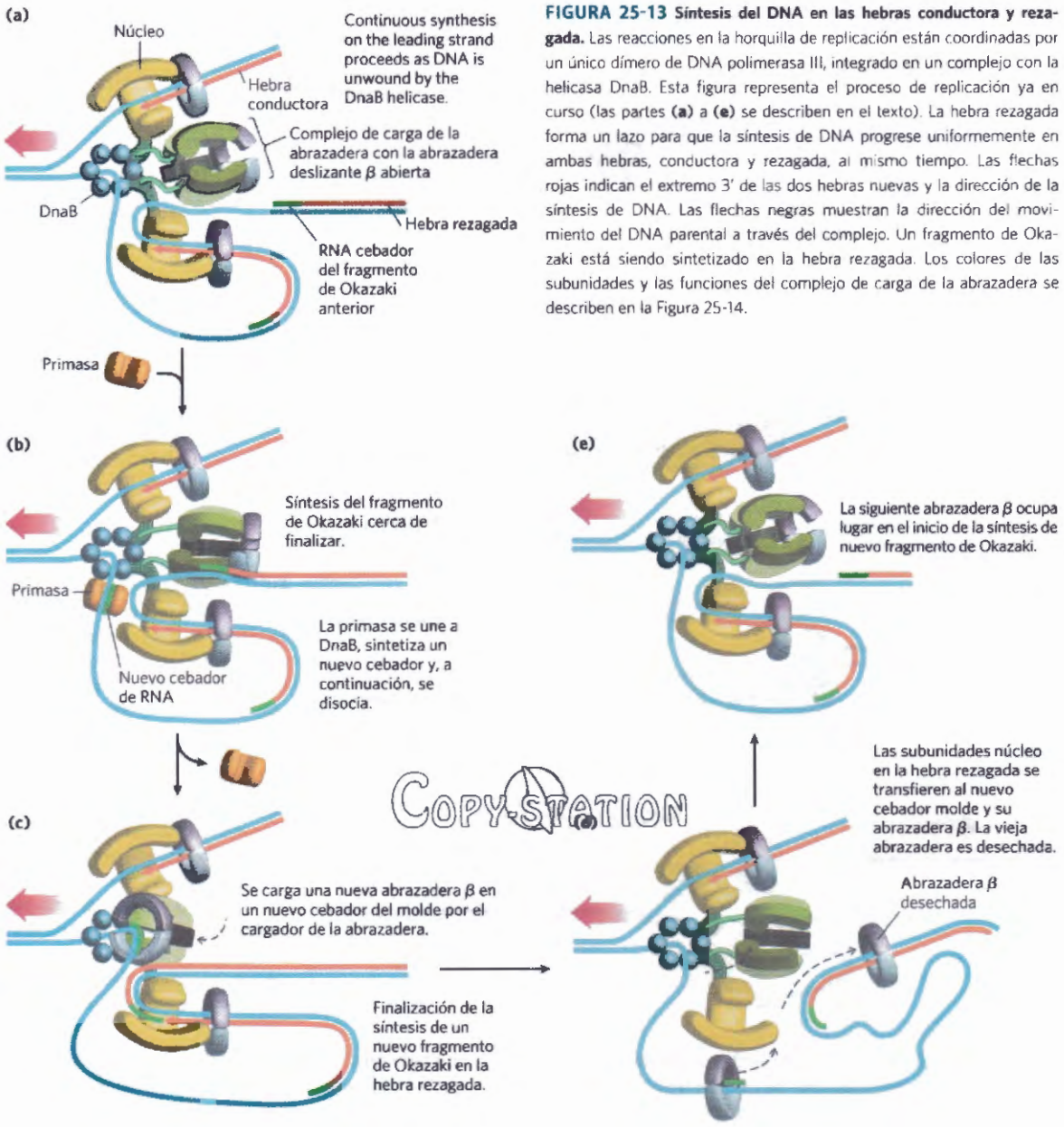


FIGURA 25-13 Síntesis del DNA en las hebras conductora y rezagada. Las reacciones en la horquilla de replicación están coordinadas por un único dímero de DNA polimerasa III, integrado en un complejo con la helicasa DnaB. Esta figura representa el proceso de replicación ya en curso (las partes **(a)** a **(e)** se describen en el texto). La hebra rezagada forma un lazo para que la síntesis de DNA progrese uniformemente en ambas hebras, conductora y rezagada, al mismo tiempo. Las flechas rojas indican el extremo 3′ de las dos hebras nuevas y la dirección de la síntesis de DNA. Las flechas negras muestran la dirección del movimiento del DNA parental a través del complejo. Un fragmento de Okazaki está siendo sintetizado en la hebra rezagada. Los colores de las subunidades y las funciones del complejo de carga de la abrazadera se describen en la Figura 25-14.

TABLA 25-4 Proteínas del replisoma de *E. coli*

Proteína	M_r	Número de subunidades	Función
SSB	75.600	4	Unión a DNA de cadena sencilla
Proteína DnaB (helicasa)	300.000	6	Desenrollamiento del DNA; componente del primosoma
Primasa (proteína DnaG)	60.000	1	Síntesis de RNA cebador; componente del primosoma
DNA polimerasa III	1.065.400	17	Elongación de la cadena nueva
DNA polimerasa I	103.000	1	Relleno de huecos, eliminación de cebadores
DNA ligasa	74.000	1	Ligación
DNA girasa (DNA topoisomerasa II)	400.000	4	Superenrollamiento

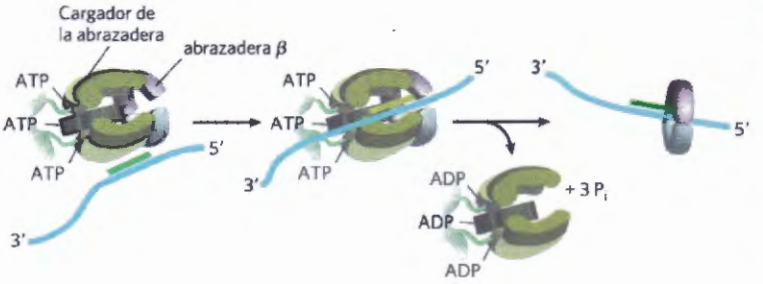


FIGURA 25-14 El cargador de la abrazadera de la DNA polimerasa III. Las cinco subunidades del complejo de carga de la abrazadera (γ) son las subunidades, δ y δ' y el dominio amino terminal de cada subunidad τ (véase la Fig. 25-9). El complejo se une a tres moléculas de ATP y a una abrazadera β dimérica. La unión fuerza la apertura de la abrazadera β en una de las interfases entre sus subunidades. La hidrólisis del ATP unido permite de nuevo el cierre de la abrazadera β alrededor del DNA.

juego de subunidades núcleo (la polimerasa núcleo) para la síntesis continua de la hebra conductora, mientras que el otro juego de subunidades núcleo circula entre un fragmento de Okazaki y el siguiente sobre el bucle formado por la hebra rezagada. In vitro, el holoenzima de la DNA polimerasa III con únicamente dos juegos de subunidades núcleo pueden sintetizar ambas hebras la conductora y la rezagada. Sin embargo, un tercer juego de subunidades incrementa la eficiencia de síntesis de la rezagada así como la procesividad del replisoma global.

La helicasa DnaB, unida por delante de la DNA polimerasa III, desenrolla el DNA en la horquilla de replicación (Fig. 25-13a) a medida que viaja a lo largo de la hebra rezagada en dirección 5'→ 3'. La primasa DnaG se asocia ocasionalmente con la helicasa DnaB y sintetiza un corto cebador de RNA (Fig. 25-13b). Una nueva abrazadera deslizante β es entonces posicionada en el cebador por el complejo de carga de la abrazadera de la DNA polimerasa III (Fig. 25-13c). Cuando se ha completado la síntesis de un fragmento de Okazaki, la replicación se detiene y las subunidades núcleo de la DNA polimerasa III se disocian de su abrazadera deslizante β (y del fragmento de Okazaki completado) y se asocian con la siguiente abrazadera (Fig. 25-13d, e). Ello inicia la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki. Dos juegos de subunidades núcleo pueden estar implicadas en la síntesis de los dos fragmentos de Okazaki diferentes al mismo tiempo. En la Tabla 25-4 se enumeran las proteínas que actúan en la horquilla de replicación.

El complejo de carga de la abrazadera de la DNA polimerasa III, consistente en parte de las dos subunidades τ, junto con las subunidades γ, δ y δ', también es una AAA + ATPasa. Este complejo se une al ATP y a la nueva abrazadera β deslizante. La unión genera tensión en la abrazadera dimérica, lo que provoca la apertura del anillo en la interfase de una de las subunidades **(Fig. 25-14)**. La hebra rezagada recién cebada se desliza al interior del anillo a través de la discontinuidad resultante. A continuación, el cargador de la abrazadera hidroliza ATP, liberando la abrazadera deslizante β que se cierra alrededor del DNA.

El replisoma verifica una rápida síntesis de DNA a un ritmo de unos ~1000 a 2000 nucleótidos por segundo en cada hebra (conductora y rezagada). Una vez ha finalizado la síntesis de un fragmento de Okazaki, su cebador de RNA es eliminado por la DNA polimerasa I o la RNasa H1, y reemplazado con DNA por la polimerasa; la mella remanente es sellada por la DNA ligasa **(Fig. 25-15)**.

La DNA ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un 3' hidroxilo, al final de una hebra de DNA y un 5' fosfato al final de otra cadena. El fosfato debe ser activado por adenilación. Las DNA ligasas aisladas de virus y eucariotas utilizan ATP con este fin. Las DNA ligasas bacterianas utilizan NAD^+, un cofactor que normalmente se usa en las reacciones de transferencia de hidruro (véase la Fig. 13-24) como fuente del grupo activador AMP **(Fig. 25-16)**. La DNA ligasa es otro enzima del metabolismo del DNA que se ha convertido en un importante reactivo en los experimentos de DNA recombinante (véase la Fig. 9-1).

Terminación Finalmente, las dos horquillas de replicación del cromosoma circular de *E. coli* se encuentran en una región terminal que contiene múltiples copias de una secuencia de 20 pb denominada Ter **(Fig. 25-17)**. Las secuencias Ter actúan en el cromosoma como una especie de trampa donde una horquilla de replicación puede entrar pero no salir. Las secuencias Ter son sitios de unión para una proteína denominada Tus (por *s*ustancia de *u*tilización del *t*erminal). El complejo Tus-Ter puede detener una horquilla de replicación desde una sola dirección. Sólo actúa un único complejo Tus-Ter por ciclo de replicación, el primero con que topa una u otra horquilla de replicación. Dado que las horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas se detienen al encontrarse, las secuencias Ter no parecen esenciales, pero es posible que sirvan para evitar la sobrerreplicación por una de las horquillas de replicación, en al caso de que la otra se haya retrasado o detenido a causa de daños en el DNA o por algún otro obstáculo.

Así pues, cuando una u otra horquilla de replicación topa con un complejo funcional Tus-Ter se detiene; la

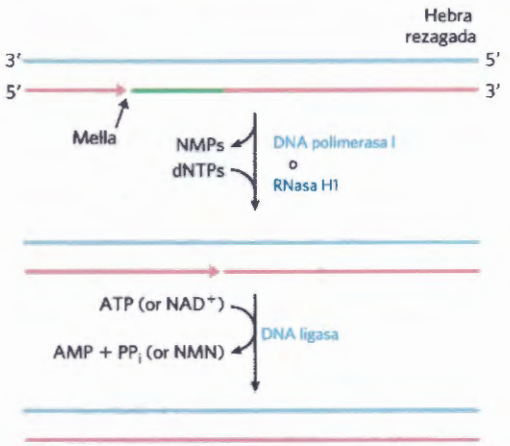


FIGURA 25-15 Etapas finales de la síntesis de los segmentos de la hebra rezagada. Los cebadores de RNA de la hebra rezagada son eliminados por la actividad exonucleasa 5'→3' de la DNA polimerasa I, siendo reemplazados con DNA por el mismo enzima. La mella restante es sellada por la DNA ligasa. El papel del ATP o del NAD^+ se muestra en la Fig. 25-16.

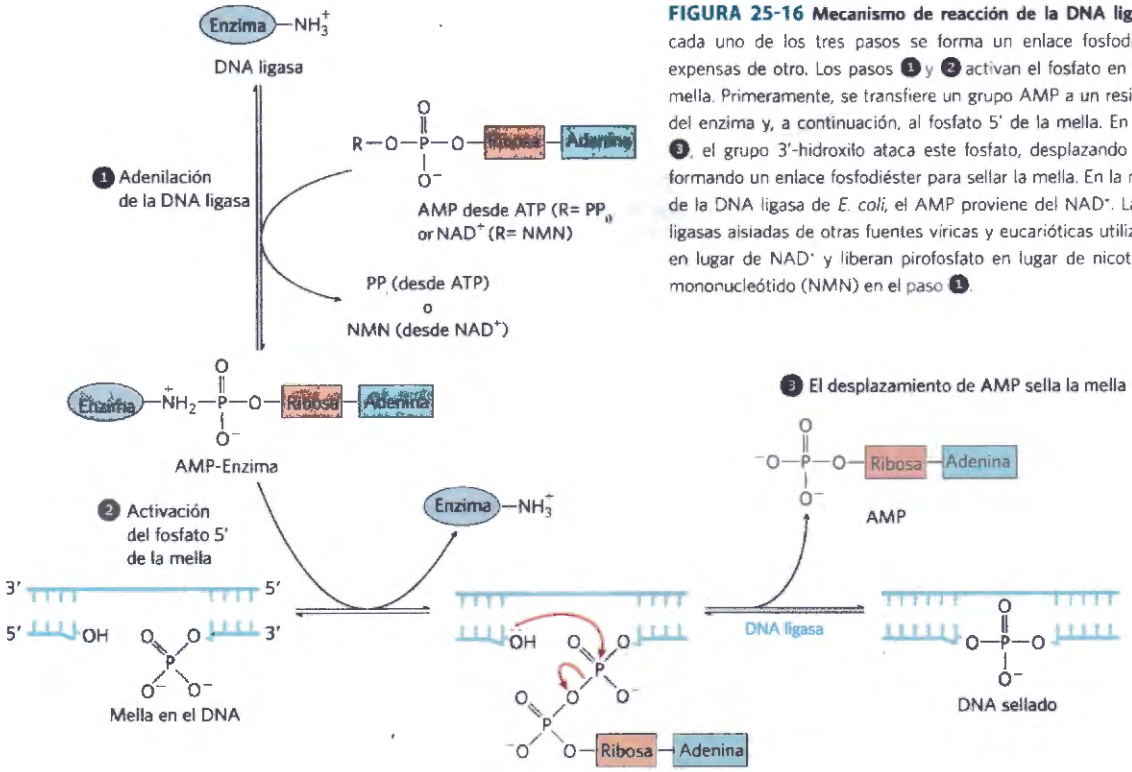


FIGURA 25-16 Mecanismo de reacción de la DNA ligasa. En cada uno de los tres pasos se forma un enlace fosfodiéster a expensas de otro. Los pasos ❶ y ❷ activan el fosfato en 5' de la mella. Primeramente, se transfiere un grupo AMP a un residuo Lys del enzima y, a continuación, al fosfato 5' de la mella. En el paso ❸, el grupo 3'-hidroxilo ataca este fosfato, desplazando AMP y formando un enlace fosfodiéster para sellar la mella. En la reacción de la DNA ligasa de *E. coli*, el AMP proviene del NAD^+. Las DNA ligasas aisladas de otras fuentes víricas y eucarióticas utilizan ATP en lugar de NAD^+ y liberan pirofosfato en lugar de nicotinamida mononucleótido (NMN) en el paso ❶.

otra horquilla se detiene cuando encuentra la primera horquilla (ya detenida). Los pocos centenares de pares de bases finales entre estos grandes complejos proteicos se replican a continuación (mediante un mecanismo todavía desconocido). El resultado final son dos cromosomas circulares ligados en el espacio (encadenados) **(Figura 25-18)**. Los círculos de DNA unidos de este modo se denominan **catenanos.** La separación de los círculos encadenados en *E. coli* requiere topoisomerasa IV (una topoisomerasa de tipo II). Los cromosomas separados se segregan entre las células hijas en la división celular. La fase terminal de la replicación de otros cromosomas circulares, incluidos muchos virus de DNA que infectan células eucarióticas, es similar.

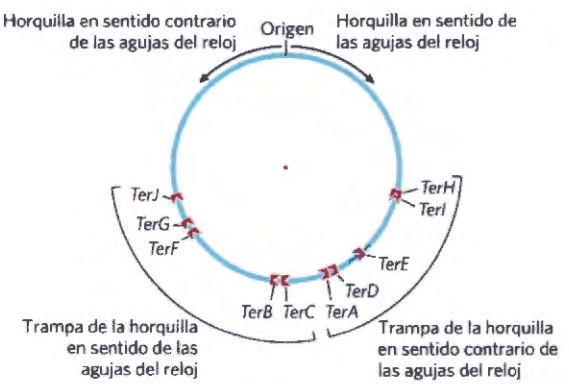


FIGURA 25-17 Terminación de la replicación del cromosoma en *E. coli*. Las secuencias Ter (de *TerA* hasta *TerJ*) se encuentran dispuestas en el cromosoma en dos grupos con orientación opuesta.

La replicación en las células eucarióticas es similar pero más compleja

Las moléculas de DNA de las células eucarióticas son considerablemente mayores que las de las bacterias y están organizadas en estructuras nucleoproteicas complejas (cromatina; p. 972). Los rasgos esenciales de la replicación del DNA son los mismos en los eucariotas y en las bacterias y muchos de los complejos proteicos están funcional y estructuralmente conservados. No obstante, la replicación eucariótica está regulada y coordinada con el ciclo celular, lo cual introduce algunas complejidades adicionales.

Los orígenes de replicación tienen una estructura bien caracterizada en algunos eucariotas inferiores, pero están mucho menos definidos en los eucariotas superiores. En los vertebrados, diversas secuencias ricas en A=T pueden usarse en el inicio de la replicación, y los sitios pueden variar de una división celular a otra. La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) tiene orígenes de replicación definidos, denominados secuencias de *r*eplicación *a*utónoma (ARS) o **replicadores**. Los replicadores de levadura abarcan unos 150 pb y contienen varias secuencias esenciales conservadas. En el genoma haploide de levadura se encuentran unos 400 replicadores repartidos en los 16 cromosomas del genoma haploide.

La regulación asegura que todo el DNA celular sólo se replica una vez por ciclo. Esta regulación depende en gran parte de proteínas denominadas ciclinas y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) con las cuales forman complejos. Las ciclinas se destruyen rápidamente por proteólisis dependiente de ubiquitina al final de la fase M (mitosis), y la ausencia de ciclinas permite la formación de **complejos prerreplicativos (pre-RC)** en los sitios de iniciación de la replicación. En las célu-

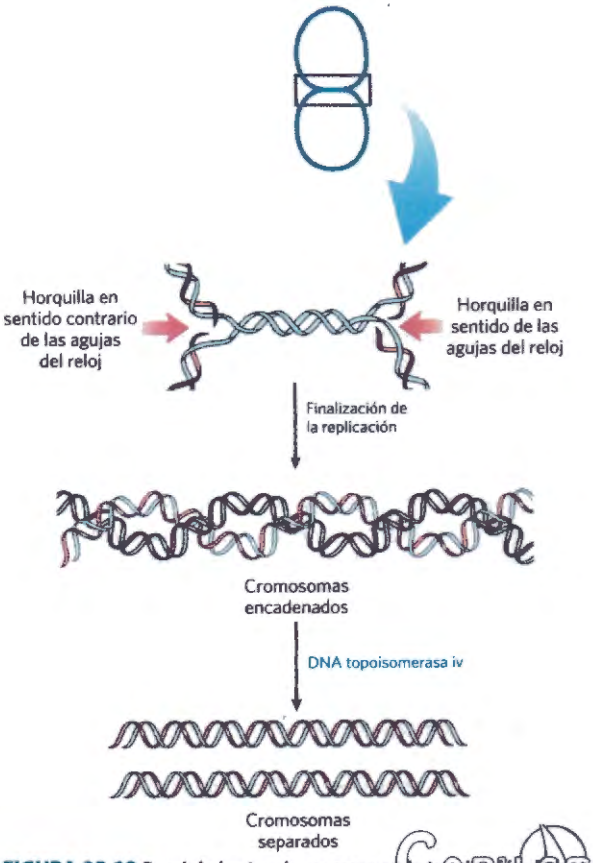


FIGURA 25-18 Papel de las topoisomerasas en la terminación de la replicación. La replicación del DNA entre las horquillas de replicación opuestas deja los cromosomas recién completados encadenados, es decir, círculos ligados topológicamente. Los círculos no están unidos covalentemente, pero no pueden separarse porque están entrelazados y cerrados covalentemente. La separación de los círculos encadenados requiere la acción de las topoisomerasas. En *E. coli*, una topoisomerasa de tipo II, llamada topoisomerasa IV, tiene el papel principal en la separación de los cromosomas encadenados; corta transitoriamente las dos hebras de DNA de uno de los cromosomas, permitiendo que el otro cromosoma pase a través de la brecha.

COPYSTATION

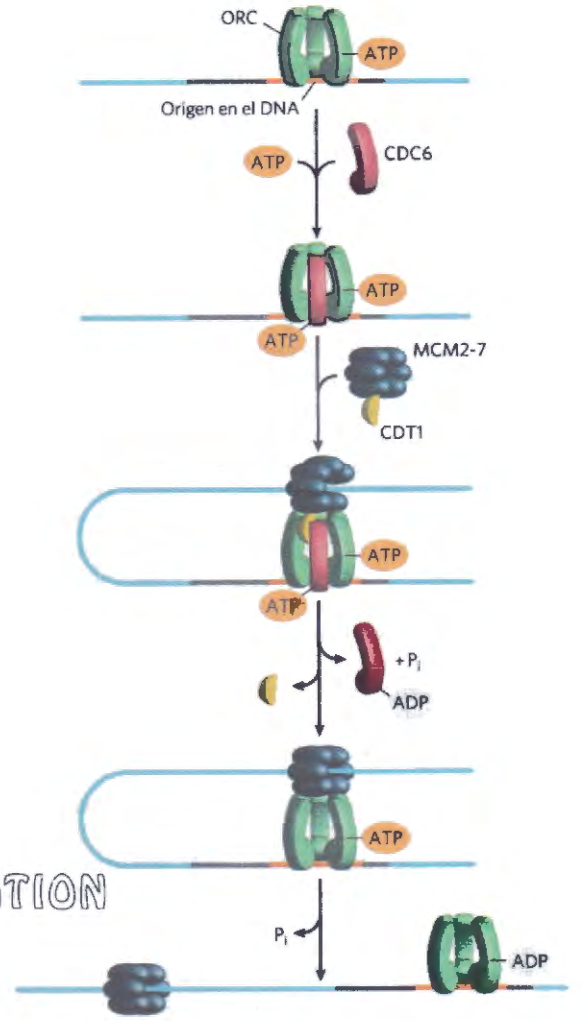


FIGURA 25-19 Formación de un complejo prereplicativo en un origen de replicación eucariótico. Las proteínas ORC, CDC6 y CDT1 se unen al sitio de inicio (origen). Estas proteínas, muchas de ellas AAA + ATPasas, inducen la carga de la helicasa replicativa, MCM2-7, en una reacción análoga a la carga de la helicasa bacteriana DnaB por la proteína DnaC. La carga del complejo MCM de la helicasa en el DNA forma el complejo prerreplicativo, o preRC, que es el paso determinante del inicio de la replicación. [Fuente: Información de U. Sivaprasad et al. en DNA Replication and Human Disease (M. L. DePamphilis, ed.) p. 141, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006]

las en rápido crecimiento, los pre-RC se forman al final de la fase M. En las células de crecimiento lento no se forman hasta el final de G1. La formación de los pre-RC hace que la célula sea competente para la replicación, hecho a veces denominado **autorización**.

Como en las bacterias, el acontecimiento clave del inicio de la replicación en todos los eucariotas es la carga de la helicasa replicativa, un complejo heterohexamérico de **proteínas de mantenimiento del minicromosoma (MCM)** (de MCM2 a MCM7). La helicasa MCM2-7 tiene forma de anillo y funciona de forma similar a la helicasa DnaB bacteriana, aunque es translocada 3'→ 5' a lo largo de la cadena molde conductora. Se asocia al DNA mediante otro complejo de seis proteínas denominado **ORC (complejo de reconocimiento del origen)** (**Fig. 25-19**). El ORC tiene cinco dominios AAA + ATPasa en sus subunidades y es funcionalmente análogo a la DnaA bacteriana. Otras dos proteínas, CDC6 (*c*iclo de *d*ivisión *c*elular) y CDT1 (*t*ranscrito *1* *d*ependiente de *C*DC10), son necesarias para cargar el complejo MCM2-7. La CDC6 de levadura es otra AAA + ATPasa.

El compromiso hacia la replicación requiere la síntesis y la actividad de complejos de ciclina-CDK en la fase S (tales como el complejo E-CDK2; véase la Fig. 12-46) y CDC7-DBF-4. Ambos tipos de complejos contribuyen a la activación de la replicación, uniéndose y fosforilando varias proteínas en el pre-RC. Otras ciclinas y CDK inhiben la formación de más complejos pre-RC una vez ha comenzado la replicación. Por ejemplo, La CDK2 se une a la ciclina A cuando los niveles de ciclina E disminuyen durante la fase S, inhibiendo de esta manera la CDK2 con lo que se impide la formación de nuevos complejos pre-RC.

La velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación en los eucariotas (unos 50 nucleótidos/segundo) es sólo una vigésima parte de la observada en *E. coli*. A esta velocidad, la replicación de un cromoso-

ma humano de tamaño medio que avanzara a partir de un solo origen tardaría más de 500 horas. La replicación de los cromosomas humanos de hecho tiene lugar bidireccionalmente a partir de múltiples orígenes situados entre 30 y 300 kpb uno de otro. Los cromosomas eucarióticos son casi siempre mucho mayores que los cromosomas bacterianos; la presencia de múltiples orígenes es, pues, probablemente, una característica general de las células eucarióticas.

Al igual que en las bacterias, en las células eucarióticas hay varios tipos de DNA polimerasas. Algunas se han asociado a funciones especiales tales como la replicación del DNA mitocondrial. En la replicación de los cromosomas nucleares intervienen principalmente tres DNA polimerasa formadas por múltples subunidades. La altamente procesiva **DNA polimerasa** ε sintetiza la hebra conductora, y la **DNA polimerasa** δ sintetiza la hebra rezagada. Ambos enzimas tienen actividad exonucleasa 3'→ 5' correctora de pruebas. La **DNA polimerasa** α una DNA polimerasa/primasa, sintetiza los cebadores de RNA y también los extiende por aproximadamente 10 nucleótidos de DNA. Una de las subunidades de la DNA polimerasa α tiene actividad primasa y la subunidad mayor (M_r ~180.000) contiene la actividad polimerizante. Sin embargo, esta polimerasa carece de actividad exonucleasa 3'→ 5' correctora de pruebas, lo que la hace inadecuada para la síntesis fiel de DNA.

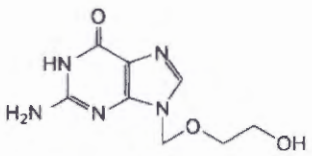
La DNA polimerasa ε y δ están asociadas con y simultáneamente al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA; M_r 29.000), que es una proteína que se encuentra en grandes cantidades en el núcleo de las células en proliferación. La estructura tridimensional del PCNA es sorprendentemente parecida a la de la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli* (véase Fig. 25-9b), aunque la homología de secuencia primaria no sea evidente. La función de PCNA es similar a la de la subunidad β, pues forma una abrazadera circular que potencia mucho la procesividad de las dos polimerasas.

En la replicación del DNA eucariótico también actúan otros dos complejos proteicos. La RPA (Proteína de replicación A) es una proteína eucariótica de unión a DNA de cadena sencilla, equivalente funcionalmente a la proteína SSB de *E. coli*. El RFC (factor de replicación C) es un cargador de abrazadera para PCNA que facilita la formación de complejos de replicación activos. Las subunidades del complejo RFC tienen una similitud de secuencia significativa con las subunidades con el complejo bacteriano (γ) de carga de la abrazadera.

La terminación de la replicación de los cromosomas eucarióticos lineales requiere la síntesis de unas estructuras especiales denominadas **telómeros** en los extremos del cromosoma, que serán estudiadas en el siguiente capítulo.

Las DNA polimerasas víricas son dianas de las terapias antivíricas

Muchos virus de DNA codifican sus propias DNA polimerasas, algunas de las cuales son dianas farmacológicas. Por ejemplo, la DNA polimerasa del virus hérpex simple es inhibida por el aciclovir, un compuesto desarrollado por Gertrude Elion y George Hitchings. El aciclovir consiste en una guanina unida a un anillo incompleto de ribosa.



Aciclovir

Se fosforila por una timidina quinasa codificada por el virus; el aciclovir se une al enzima vírico con una afinidad 200 veces mayor que a la timidina quinasa celular. Ello garantiza que la fosforilación tenga lugar principalmente en las células infectadas por el virus. Las quinasas celulares convierten el aciclo-GMP resultante en aciclo-GTP, que es a la vez sustrato e inhibidor de las DNA polimerasas; el aciclo-GTP inhibe competitivamente la DNA polimerasa del hérpex más fuertemente que a las DNA polimerasas celulares. Al carecer de un 3' hidroxilo, el aciclo-GTP también actúa de terminador de la cadena cuando se incorpora al DNA. La replicación del virus es, pues, inhibida en diferentes etapas. ■

RESUMEN 25.1 Replicación del DNA

■ La replicación del DNA tiene lugar con gran fidelidad en un momento definido del ciclo celular. La replicación es semiconservadora, cada hebra actúa de molde para una nueva hebra hija. Tiene lugar en tres fases perfectamente diferenciables: iniciación, elongación y terminación. El proceso comienza en un origen único en las bacterias y generalmente avanza bidireccionalmente.

■ El DNA es sintetizado en dirección 5 → 3' por las DNA polimerasas. En la horquilla de replicación, la hebra conductora se sintetiza continuamente en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación; la hebra rezagada se sintetiza de forma discontinua en fragmentos de Okazaki, que son posteriormente unidos.

■ La fidelidad de la replicación del DNA depende de (1) la selección de bases por la polimerasa, (2) una actividad exonucleasa 3'→ 5' correctora de pruebas que forma parte de la mayoría de polimerasas y (3) mecanismos específicos de reparación para los desapareamientos dejados atrás por la replicación.

■ La mayoría de células tienen varias DNA polimerasas. En *E. coli*, la DNA polimerasa III es el enzima de replicación principal. La DNA polimerasa I es responsable de funciones especiales durante la replicación, la recombinación y la reparación.

■ Las fases separadas de iniciación, elongación y terminación de la replicación del DNA ponen en juego un conjunto de enzimas y factores proteicos, muchos de los cuales pertenecen a la familia de la AAA + ATPasa.

■ Las principales DNA polimerasas replicativas de los eucariotas son la DNA polimerasa ε y δ. La DNA polimerasa α sirve para sintetizar cebadores.

25.2 Reparación del DNA

La mayoría de células sólo tienen una o dos copias de DNA genómico. Las proteínas y las moléculas de RNA

dañadas pueden ser reemplazadas rápidamente utilizando información codificada en el DNA; en cambio, las propias moléculas de DNA son irreemplazables. El mantenimiento de la integridad de la información contenida en el DNA es, por tanto, un imperativo celular, al que responde un elaborado conjunto de sistemas de reparación del DNA. El DNA puede resultar dañado por diversos procesos, algunos espontáneos, otros catalizados por agentes ambientales (Capítulo 8). La propia replicación puede, ocasionalmente, dañar la información genética al dejar, por error, bases mal apareadas (tal como G apareada con T).

La química de las lesiones del DNA es compleja y diversa. La respuesta celular a las lesiones consiste en una amplia gama de sistemas enzimáticos que catalizan algunas de las transformaciones químicas más interesantes del metabolismo del DNA. En primer lugar examinaremos los efectos de las alteraciones en la secuencia del DNA y a continuación describiremos algunos sistemas de reparación específicos.

Las mutaciones están relacionadas con el cáncer

La mejor manera de ilustrar la importancia de la reparación del DNA es considerar los efectos de una lesión del DNA *no reparada*. La consecuencia más importante es un cambio en la secuencia de bases del DNA que, si se replica y transmite a las generaciones futuras, se hace permanente. Un cambio permanente de la secuencia de nucleótidos del DNA se denomina **mutación**. Las mutaciones pueden consistir en la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución) o la adición o eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones por inserción y deleción). Si la mutación afecta a DNA no esencial o si tiene un efecto inapreciable en la función de un gen, se denomina **mutación silenciosa**. Las mutaciones raramente confieren ventajas biológicas. No obstante, la mayoría de las mutaciones no silenciosas son neutras o deletéreas.

En los mamíferos hay una estrecha correlación entre la acumulación de mutaciones y el cáncer. Un sencillo ensayo desarrollado por Bruce Ames mide el potencial de un determinado compuesto químico para producir mutaciones fácilmente detectables en una cepa bacteriana especializada **(Fig. 25-20)**. Pocos de los productos químicos con que estamos en contacto habitualmente aparecen como mutagénicos en esta prueba. Sin embargo, de los compuestos reconocidos como carcinogénicos en pruebas exhaustivas en animales, más del 90% son también mutagénicos en la prueba de Ames. Debido a esta importante correlación entre mutagénesis y carcinogénesis, la prueba de Ames para mutágenos bacterianos se utiliza ampliamente como forma de rastreo rápida y barata de potenciales carcinógenos humanos.

El genoma de una célula típica de mamífero acumula muchos millares de lesiones en un período de 24 horas. No obstante, gracias a la reparación del DNA, menos de una lesión de cada 1000 se transforma en una mutación. El DNA es una molécula relativamente estable, pero sin sistemas de reparación, el efecto acumulativo de muchas reacciones poco frecuentes pero dañinas haría que la vida no fuese posible. ■

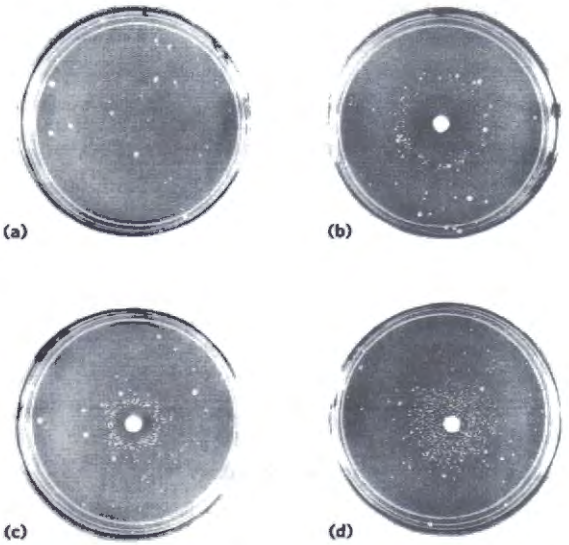


FIGURA 25-20 Prueba de Ames para carcinógenos basada en su mutagenicidad. Se siembran células de una cepa de *Salmonella typhimurium* con una mutación que inactiva un enzima de la ruta biosintética de la histidina en un medio de cultivo sin histidina. Crecen pocas células. **(a)** Las pequeñas y escasas colonias de *S. typhimurium* que crecen en un medio sin histidina poseen retromutaciones espontáneas que permiten que funcione la ruta biosíntetica de la histidina. Se inoculan tres placas con el mismo medio de cultivo **(b)**, **(c)** y **(d)** con un número igual de células. Se coloca en cada placa un disco de papel de filtro que contiene concentraciones progresivamente decrecientes de un mutágeno. El mutágeno aumenta considerablemente la tasa de retromutación y, en consecuencia, el número de colonias. Las áreas claras alrededor del papel de filtro muestran que allí la concentración de mutágeno es tan elevada que es letal para las células. A medida que el mutágeno difunde desde el papel de filtro, se diluye hasta concentraciones subletales que inducen la retromutación. Los mutágenos pueden compararse por su efecto sobre la tasa de mutación. Debido a que muchos compuestos experimentan una serie de transformaciones químicas cuando penetran en las células, a veces se prueba la mutagenicidad de los compuestos después de incubarlos con un extracto de hígado. Algunos compuestos son mutagénicos sólo después de este tratamiento. [Fuente: Bruce N. Ames, University of California, Berkeley, Department of Biochemistry and Molecular Biology.]

Todas las células tienen múltiples sistemas de reparación del DNA

El número y diversidad de los sistemas de reparación refleja a la vez la importancia de la reparación del DNA para la supervivencia de la célula y la variedad de causas que originan las lesiones en el DNA (Tabla 25-5). Algunos tipos de lesiones comunes, tales como los dímeros de pirimidina (véase la Fig. 8-31), pueden ser reparados por varios sistemas diferentes. Muchos procesos de reparación del DNA son extraordinariamente ineficaces en términos energéticos, en franco contraste con las rutas metabólicas, donde cada ATP se utiliza de manera óptima y justificada. Cuando está en juego la integridad de la información genética, la cantidad de energía química invertida en un proceso de reparación parece no tener importancia.

La reparación del DNA es posible en gran parte debido a que la molécula de DNA consta de dos cadenas complementarias. La lesión del DNA en una cadena puede ser eliminada y reemplazada de forma precisa, usando de molde la cadena complementaria no dañada.

TABLA 25-5 Tipos de sistemas de reparación del DNA en *E. coli*

Enzimas/proteínas	Tipo de lesión
Reparación de apareamientos incorrectos	
Dam metilasa Proteínas MutH, MutL, MutS DNA helicasa II SSB DNA polimerasa III Exonucleasa I Exonucleasa VII Nucleasa RecJ Exonucleasa X DNA ligasa	Apareamientos incorrectos
Reparación por escisión de base	
DNA glucosilasas Endonucleasas AP DNA polimerasa I DNA ligasa	Bases no habituales (uracilo, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; dímeros de pirimidina en algún otro organismo
Reparación por escisión de nucleótido	
ABC excinucleasa DNA polimerasa I DNA ligasa	Lesiones del DNA que causan importantes cambios estructurales (p.ej., dímeros de pirimidina)
Reparación directa	
DNA fotoliasas	Dímeros de pirimidina
O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa	O^6-metilguanina
Proteína AlkB	1-Metilguanina 3-metilcitosina

A continuación, consideraremos los tipos principales de sistemas de reparación, empezando con aquellos que reparan los escasos apareamientos incorrectos que quedan después de la replicación.

Reparación de apareamientos incorrectos La corrección de los raros apareamientos incorrectos después de la replicación en *E. coli* mejora la fidelidad global de la replicación en un factor de 10^2 a 10^3. Los apareamientos incorrectos se corrigen casi siempre de acuerdo con la información contenida en la cadena molde; por ello el sistema ha de ser capaz de discriminar de algún modo entre la cadena molde y la recién sintetizada. La célula logra este objetivo marcando el DNA molde con grupos metilo para distinguirlo de las cadenas nuevas recién sintetizadas. El sistema de reparación de apareamientos incorrectos en *E. coli* consta de al menos 12 componentes proteicos (Tabla 25-5), que funcionan en la discriminación de las hebras o bien en el propio proceso de reparación.

El mecanismo de discriminación de las hebras de la mayoría de bacterias y eucariotas es desconocido, pero se conoce bien en *E. coli* y algunas bacterias relacionadas. En estas bacterias, la discriminación de hebra se basa en la acción de la Dam metilasa, que, como se

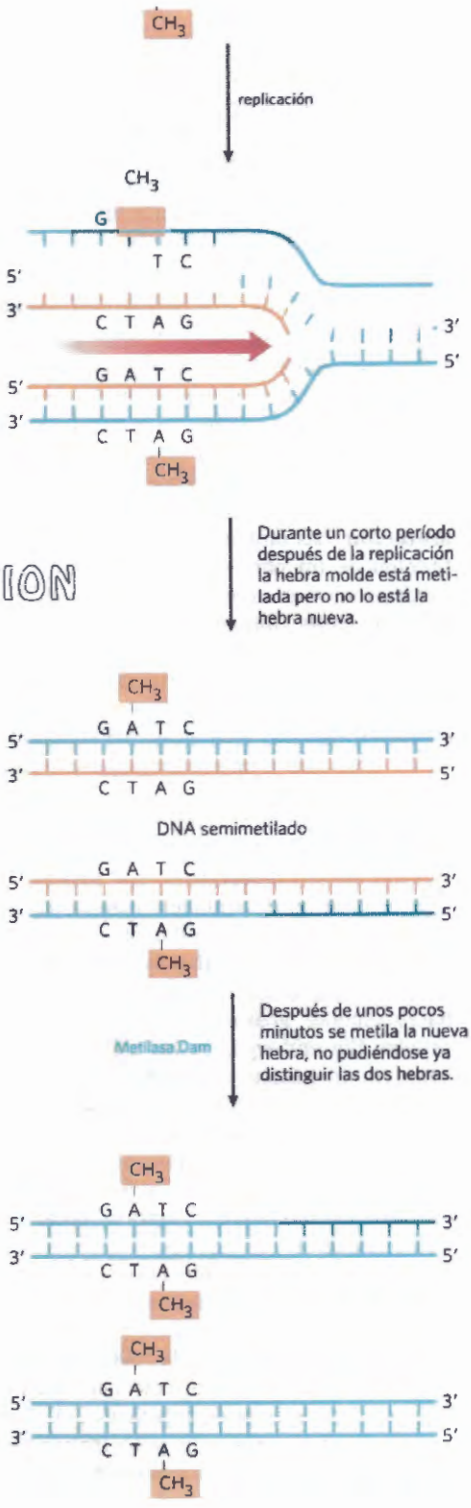


FIGURA 25-21 Metilación y reparación de apareamientos incorrectos. La metilación de cadenas de DNA puede servir para distinguir las hebras parentales (molde) de las hebras recién sintetizadas en el DNA de *E. coli*, capacidad imprescindible para la reparación de apareamientos incorrectos (véase la Fig. 25-22). La metilación tiene lugar en el N^6 de las adeninas en las secuencias (5')GATC. Esta secuencia es un palíndromo (véase la Fig. 8-18), presente en orientaciones opuestas sobre las dos cadenas.

COPY-STATION

recordará, metila el DNA en la posición N^6 de todas las adeninas presentes en las secuencias (5') GATC. Inmediatamente después del paso de la horquilla de replicación, hay un corto período de tiempo (unos pocos segundos o minutos), durante el cual la hebra molde está metilada mientras que la cadena recién sintetizada todavía no lo está **(Fig. 25-21)**. El estado transitorio sin metilar de las secuencias GATC de la cadena recién sintetizada permite distinguir entre ésta y la hebra molde. Los apareamientos incorrectos en la vecindad de una secuencia GATC semimetilada se reparan seguidamente de acuerdo con la información contenida en la hebra parental (molde) metilada. Si ambas hebras están metiladas son pocos los apareamientos incorrectos reparados, si ninguna de las dos hebras está metilada, hay reparación, pero ninguna de las dos hebras está favorecida. Este sistema de reparación de apareamientos incorrectos dirigido por metilación repara correctamente los errores a una distancia de hasta 1.000 pb de una secuencia GATC semimetilada.

¿De qué modo las secuencias GATC relativamente distantes dirigen el proceso de reparación de apareamientos incorrectos? En la **Figura 25-22** se muestra un mecanismo. La proteína MutL forma un complejo con la proteína MutS y el complejo se une a todos los pares de bases mal apareados (excepto C-C). La proteína MutH se une a la proteína MutL y a las secuencias GATC que haya encontrado el complejo MutL-MutS. El paso del DNA a ambos lados del apareamiento incorrecto a través del complejo MutL-MutS forma un lazo de DNA; el paso simultáneo de ambos extremos del lazo a través del complejo es equivalente al movimiento del complejo en ambas direcciones a la vez a lo largo del DNA. MutH tiene una actividad endonucleasa con especificidad de secuencia, que se mantiene inactiva hasta que el complejo encuentra una secuencia GATC semimetilada. En estos sitios, MutH cataliza el corte de la cadena no metilada por el lado 5' de la G de GATC, que de este modo marca la hebra que ha de repararse. Los siguientes pasos de la ruta dependen del lugar donde esté situado el apareamiento incorrecto en relación con el sitio de corte **(Fig. 25-23)**.

Cuando el desapareamiento se encuentra en el lado 5' del sitio de corte (Fig. 25-23, lado derecho), la hebra sin metilar se desenrrolla y degrada en dirección 3'→5', a partir del sitio de corte hasta más allá del desapareamiento, siendo después reemplazada por nuevo DNA. Este proceso requiere la acción combinada de DNA helicasa II (también llamada UvrD helicasa), SSB, exonucleasa I o bien exonucleasa X (ambas degradan las hebras del DNA en dirección 3'→5') o exonucleasa VII (degrada DNA monohebra en ambas direcciones), DNA polimerasa III y DNA ligasa. La ruta para la reparación de apareamientos incorrectos en el lado 3' del sitio de corte es similar, excepto que la exonucleasa es la exonucleasa VII o la nucleasa RecJ (que degrada DNA monohebra en dirección 5'→3').

La reparación de apareamientos incorrectos es un proceso especialmente costoso en energía para *E. coli*. El apareamiento incorrecto puede estar a 1.000 pb o más de la secuencia GATC. La degradación y sustitución de un segmento de cadena de esta longitud representa una enorme inversión en precursores desoxinucleótidos activados para reparar un único apareamiento incorrecto. Esto demuestra, una vez más, la importancia del mantenimiento de la integridad genómica de la célula.

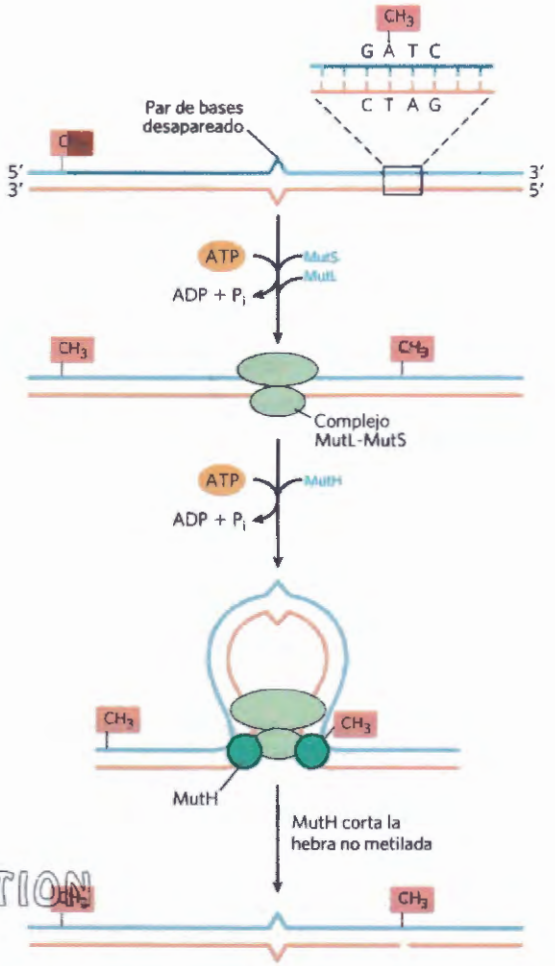


FIGURA 25-22 Modelo para las primeras etapas de la reparación de apareamientos incorrectos dirigida por metilación. Se han purificado las proteínas implicadas en este proceso en *E. coli* (véase la Tabla 25-5). El reconocimiento de la secuencia (5')GATC y del apareamiento incorrecto son funciones especializadas de las proteínas MutH y MutS, respectivamente. La proteína MutL forma un complejo con MutS en el apareamiento incorrecto. El DNA se hace pasar a través de este complejo, de manera que el complejo se mueve simultáneamente en ambas direcciones a lo largo del DNA hasta que encuentra una proteína MutH unida a una secuencia GATC semimetilada. MutH corta la hebra no metilada en el lado 5' de la G en esta secuencia. Un complejo formado por DNA helicasa II y una de entre varias exonucleasas degrada la hebra del DNA no metilada a partir de este punto hacia el apareamiento incorrecto (véase la Fig. 25-23). [Fuente: Información de la figura proporcionada por Paul Modrich]

Todas las células eucarióticas tienen varias proteínas estructural y funcionalmente análogas a las proteínas bacterianas MutS y MutL (pero no MutH). Las alteraciones en los genes humanos que codifican proteínas de este tipo provocan algunos de los síndromes hereditarios de susceptibilidad al cáncer más comunes (véase el Recuadro 25-1; p. 1015), lo cual constituye una prueba más de la importancia de los sistemas de reparación de DNA para el organismo. Las principales proteínas homólogas de MutS en la mayoría de eucariotas, de las levaduras a los humanos, son MSH2 (homóloga de

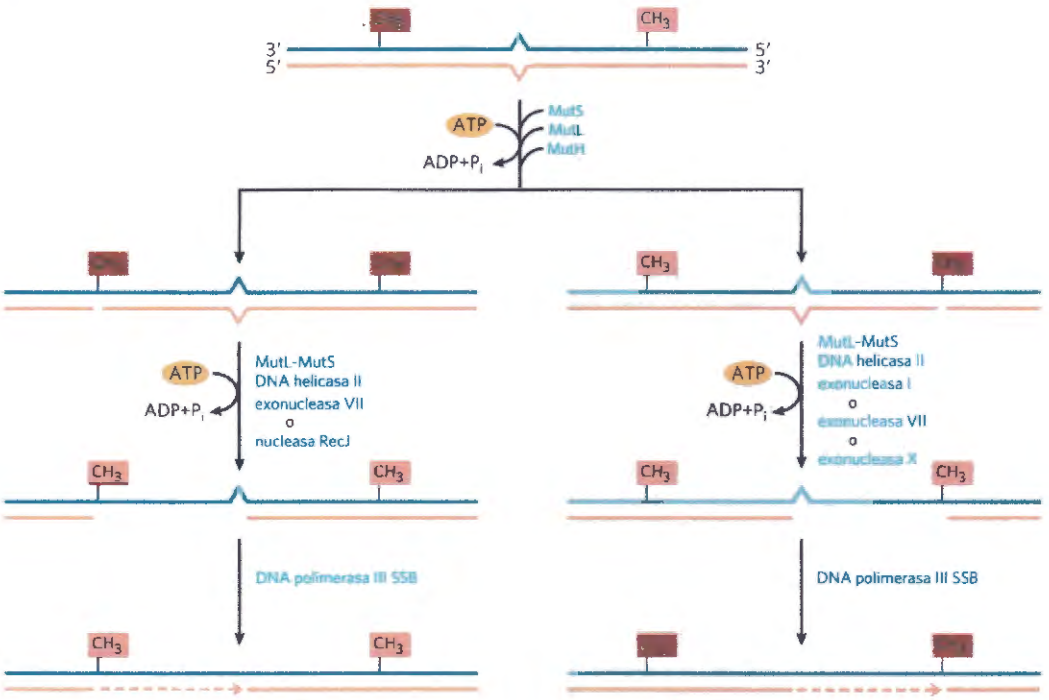


FIGURA 25-23 Finalización de la reparación de apareamientos incorrectos dirigida por metilación. La acción combinada de la DNA helicasa II, la SSB y una de entre cuatro exonucleasas diferentes elimina un segmento de la hebra nueva entre el sitio de corte de MutH y un punto justo más allá del apareamiento incorrecto. La exonucleasa utilizada depende de la localización del sitio de corte en relación con el apareamiento incorrecto tal como se indica mediante las rutas alternativas mostradas. El hueco resultante es rellenado (línea de trazos) por la DNA polimerasa III y la mella sellada por la DNA ligasa (no mostrado).

COPY-STATION

MutS), MSH3 y MSH6. Los heterodímeros de MSH2 y MSH6 se unen generalmente a desapareamientos incorrectos de un solo par de bases y con menor afinidad a lazos desapareados algo mayores. En muchos organismos, los desapareamientos más largos (de 2 a 6 pb) pueden unirse, en cambio, a un heterodímero de MSH2 y MSH3 o por ambos tipos de heterodímero en tándem. Los homólogos de MutL, principalmente un heterodímero de MLH1 (*h*omólogo de *MutL*) y PMS1 (segregación *p*ost *m*eiótica), se unen y estabilizan a los complejos MSH. Están aún por descubrir muchos detalles de los sucesos posteriores de la reparación de apareamientos incorrectos en los eucariotas. En particular, desconocemos el mecanismo de identificación de las hebras de DNA recién sintetizadas, aunque sabemos que esta identificación de hebras no utiliza secuencias GATC.

Reparación por escisión de base Todas las células contienen una clase de enzimas denominados **DNA glucosilasas**, que reconocen lesiones del DNA muy frecuentes (tales como los productos de desaminación de la citosina y la adenina; véase la Fig. 8-30a) y eliminan la base afectada rompiendo el enlace *N*-glucosilo. El corte crea sitios apurínicos o apirimidínicos en el DNA, normalmente conocidos como sitios **sitios AP** o **abásicos**. Generalmente, cada DNA glucosilasa es específica para un tipo de lesión.

Las uracilo DNA glucosilasas, por ejemplo, encontradas en la mayoría de células, eliminan específicamente del DNA el uracilo resultante de la desaminación espontánea de la citosina. Las células mutantes que carecen de este enzima tienen una elevada tasa de mutaciones de G≡C a A=T. Esta glucosilasa no elimina el uracilo del RNA o los residuos de timina del DNA. La capacidad de distinguir la timina del producto de desaminación de la citosina (uracilo), que es necesaria para la reparación de esta última, puede ser una razón que explique por qué el DNA evolucionó hacia la timina en lugar de uracilo.

La mayoría de bacterias tienen un solo tipo de uracilo DNA glucosilasa, mientras que los humanos tienen al menos cuatro tipos con diferentes especificidades, indicio de la importancia de la eliminación del uracilo del DNA. La uracilo glucosilasa humana más abundante, la UNG, se asocia con el replisoma humano, donde elimina los residuos de U que ocasionalmente se insertan en lugar de la T durante la replicación. La desaminación de los residuos de C es 100 veces más rápida en DNA de cadena sencilla que en DNA de cadena doble, y los humanos poseen el enzima hSMUG1, que elimina cualquier residuo de U que se encuentre en DNA de cadena sencilla durante la replicación o la transcripción. Otras dos DNA glucosilasas humanas, TDG y MBD4, eliminan residuos de U o T apareados con G, generados por desaminación de citosina o 5-metilcitosina, respectivamente.

Otras DNA glucosilasas reconocen y eliminan diversas bases dañadas, tales como la formamidopirimidina y la 8-hidroxiguanina (ambas procedentes de la oxidación de las purinas), la hipoxantina (producto de la desaminación de la adenina) y bases alquiladas, tales como la 3-metiladenina y la 7-metilguanina. En algunos organismos también se han identificado glucosilasas que reconocen otras lesiones, entre ellas los dímeros de pirimidina. Recuérdese que los sitios AP también aparecen

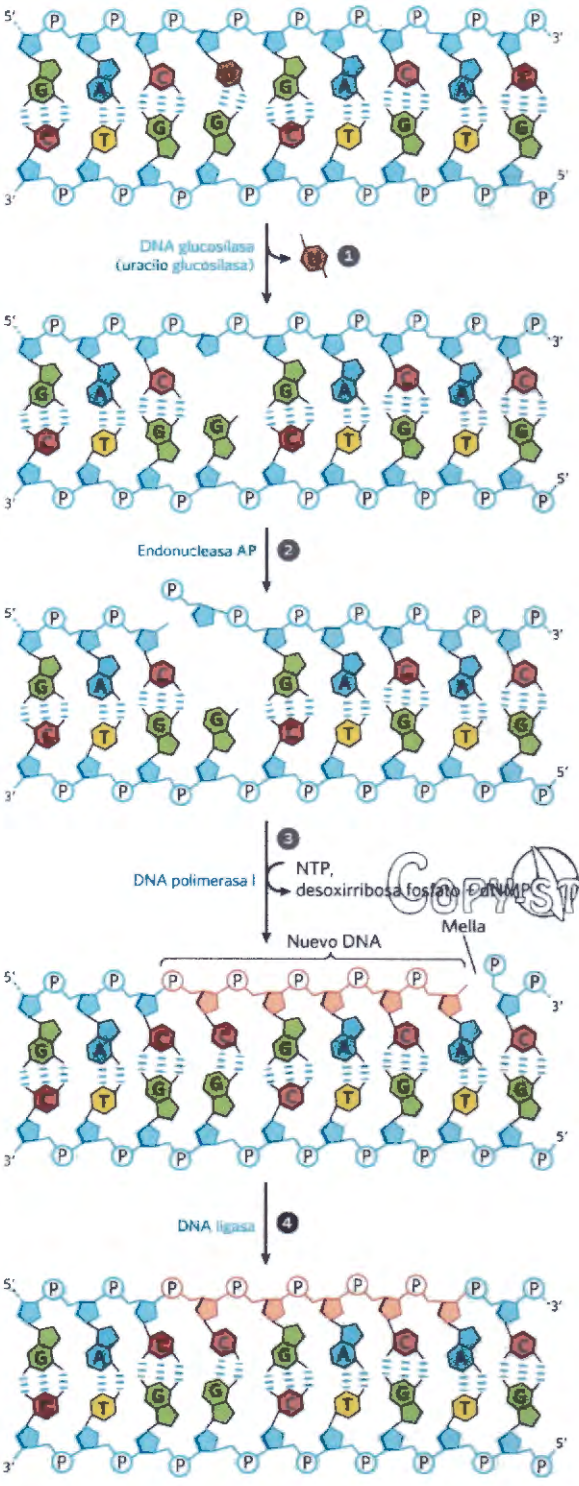


FIGURA 25-24 Reparación mediante la ruta de escisión de bases. ❶ Una DNA glucosilasa reconoce una base dañada (en este caso un uracilo) y corta entre la base y la desoxirribosa de la cadena azúcar-fosfato. ❷ Una AP endonucleasa corta la cadena fosfodiéster cerca del sitio AP. ❸ La DNA polimerasa I inicia la síntesis de reparación desde el 3' hidroxilo de la mella, eliminando y reemplazando una porción de la hebra dañada (con su actividad exonucleasa 5'→3'). ❹ La mella que queda después de disociarse la DNA polimerasa I es sellada por la DNA ligasa.

como consecuencia de la lenta hidrólisis espontánea de los enlaces *N*-glucosilo del DNA (véase la Fig. 8-29b).

Una vez formado un sitio AP por acción de una DNA glucosilasa, otro tipo de enzima ha de repararlo. La reparación *no* se realiza simplemente insertando una nueva base y reestableciendo el enlace *N*-glucosilo. En su lugar, la desoxirribosa 5'-fosfato restante es eliminada y reemplazada por un nuevo nucleótido. Este proceso empieza con enzimas denominados **AP endonucleasas**, que cortan la cadena de DNA que contiene el sitio AP. La posición de la incisión en relación con el sitio AP (5' o 3' respecto al sitio) varía según el tipo de AP endonucleasa. A continuación, se elimina un segmento de DNA que contiene el sitio AP, el DNA es reemplazado por la DNA polimerasa I y la mella restante es sellada por la DNA ligasa **(Fig. 25-24)**. En los eucariotas, la sustitución de los nucleótidos corre a cargo de polimerasas especializadas, tal como se describe a continuación.

Reparación por escisión de nucleótido Las lesiones que producen grandes distorsiones en la estructura helicoidal del DNA se reparan, generalmente, mediante el sistema de escisión de nucleótido, una vía de reparación esencial para la supervivencia de todos los organismos de vida libre. En la reparación por escisión de nucleótido **(Fig. 25-25)**, un enzima multimérico (excinucleasas) hidroliza dos enlaces fosfodiéster, uno a cada lado de la distorsión provocada por la lesión. En *E. coli* y otras bacterias, el sistema enzimático hidroliza el quinto enlace fosfodiéster en el lado 3' y el octavo enlace fosfodiéster en el lado 5' para generar un fragmento de 12 a 13 nucleótidos (según que la lesión afecte a una o a dos bases). En humanos y otros eucariotas, el sistema enzimático hidroliza el sexto enlace fosfodiéster en el lado 3' y el vigésimo segundo enlace fosfodiéster en el lado 5' para generar un fragmento de 27 a 29 nucleótidos. El oligonucleótido limitado por las dos incisiones es liberado del dúplex y el hueco resultante rellenado por la DNA polimerasa I en *E. coli* y por la DNA polimerasa ε en humanos. La mella es reparada por la DNA ligasa.

En *E. coli*, el complejo enzimático clave es la ABC excinucleasa. Está formado por tres subunidades, UvrA (M_r 104.000), UvrB (M_r 78.000), y UvrC (M_r 68.000). El término "excinucleasa" se utiliza para destacar la capacidad singular de este complejo enzimático para catalizar dos cortes endonucleolíticos específicos, que la distingue de las endonucleasas estándar. Un complejo de las proteínas UvrA y UvrB (A_2B) efectúa un barrido del DNA y se une al sitio de una lesión. A continuación, el dímero de UvrA se disocia, dejando UvrB fuertemente unida al DNA. La proteína UvrC se une entonces a UvrB, que realiza una escisión en el quinto enlace fosfodiéster en el lado 3' de la lesión. A continuación UvrC efectúa una escisión en el octavo enlace fosfodiéster en el lado 5'. El fragmento resultante de 12 o 13 nucleótidos es eliminado por la helicasa UvrD. El pequeño hueco así creado es rellenado por la DNA polimerasa I y la DNA ligasa. Esta ruta (Fig. 25-25, izquierda) es la vía principal de reparación de muchos tipos de lesiones, incluyendo los dímeros ciclobutano de pirimidina, los fotoproductos 6-4 (véase la Fig. 8-30) y varios tipos de derivados de las bases incluyendo la benzo[α]pireno-guanina, que se forma en el DNA por efecto de la exposición al humo de los cigarrillos. La actividad

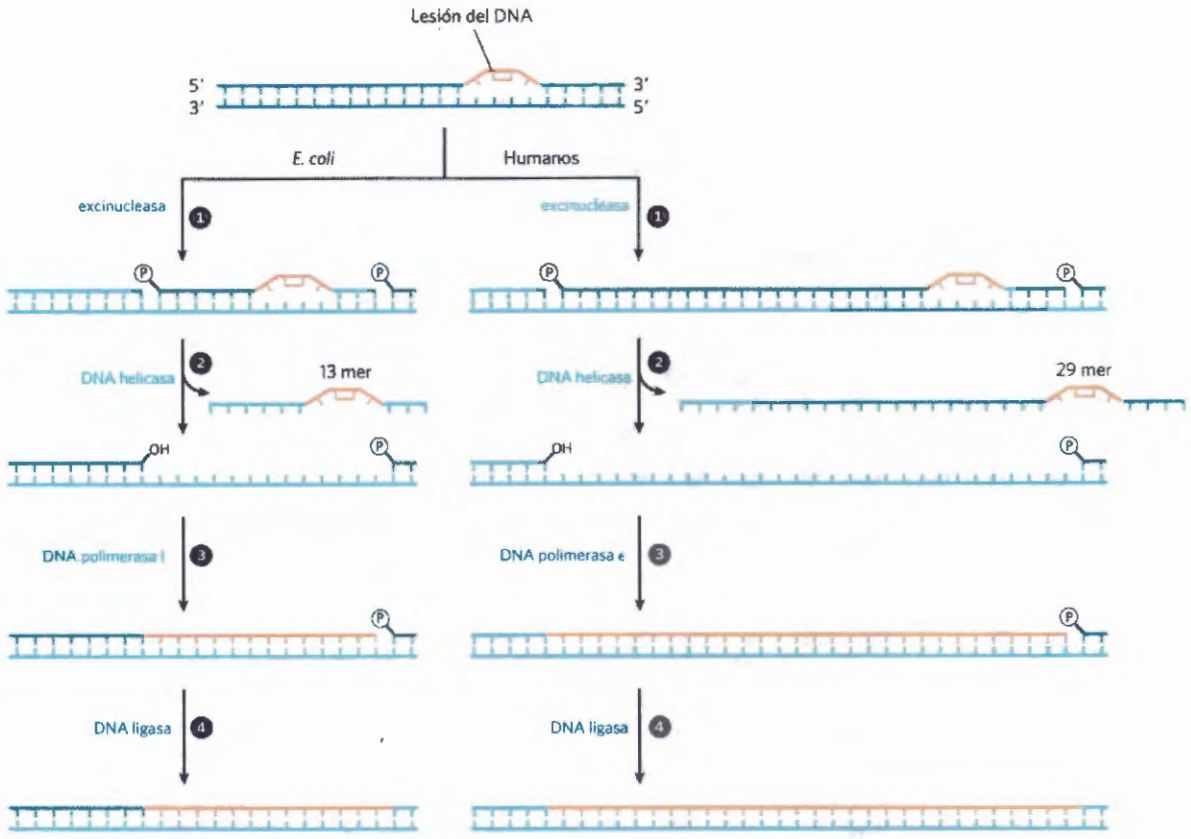


FIGURA 25-25 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos en *E. coli* y en humanos. La ruta general de reparación por escisión de nucleótidos es similar en todos los organismos. ❶ Una excinucleasa se une al DNA en el sitio donde hay una lesión de importancia y corta la hebra dañada a ambos lados de la lesión. ❷ El segmento de DNA, de 13 o de 29 nucleótidos, se elimina con ayuda de una helicasa. ❸ El hueco resultante es rellenado por la DNA polimerasa y ❹ la mella restante es sellada por la DNA ligasa. [Fuente: Información de la figura proporcionada por Aziz Sancar.]

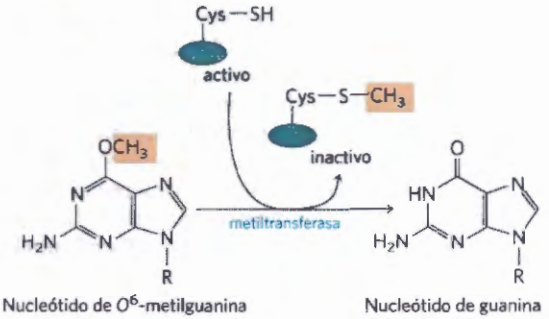
COPYSTATION

nucleolítica de la ABC excinucleasa es novedosa por cuanto efectúa dos cortes en el DNA.

El mecanismo de las excinucleasas eucarióticas es similar al del enzima bacteriano, aunque son necesarios 16 polipéptidos, que no guardan ningún parecido con las subunidades de la excinucleasa de *E. coli*, para efectuar la doble escisión. Tal como se describe en el Capítulo 26, los mecanismos de reparación por escisión de base y por escisión de nucleótido están estrechamente asociados a la transcripción. Las deficiencias genéticas en la reparación por escisión en humanos dan lugar a varias enfermedades graves (véase el Recuadro 25-1).

Reparación directa Varios tipos de lesiones se reparan sin eliminar una base o un nucleótido. El ejemplo mejor caracterizado es la fotorreactivación directa de los dímeros de pirimidina en ciclobutano, una reacción promovida por las **DNA fotoliasas**. Los dímeros de pirimidina son el producto de una reacción inducida por la luz UV y las fotoliasas utilizan energía procedente de la luz absorbida para invertir la lesión **(Fig. 25-26)**. Las fotoliasas generalmente contienen dos cofactores que actúan de agentes de absorción de la luz o cromóforos. Uno de los cromóforos es siempre el $FADH_2$. En *E. coli* y en levadura, el otro cromóforo es un folato. El mecanismo de reacción conlleva la generación de radicales libres. Las DNA fotoliasas no se encuentra en las células de los mamíferos placentarios (incluidos los humanos).

Pueden encontrarse otros ejemplos en la reparación de lesiones de nucleótidos por agentes alquilantes. cse forma en presencia de agentes alquilantes, y es una lesión común altamente mutagénica, pues tiende a aparearse con timina en lugar de citosina durante la replicación y, por tanto, genera mutaciones de G≡C a A=T **(Fig. 25-27)**. La O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa, proteína que cataliza la transferencia del grupo metilo de la O^6-metilguanina a uno de sus propios residuos de Cys lleva a cabo la reparación directa de la O^6-metilguanina. Esta metiltransferasa no es propiamente un enzima, porque una única transferencia de metilo la metila permanentemente, inactivándola en esta ruta. El consumo de una molécula entera de proteína para corregir una sola base dañada constituye una muestra más de la importancia de mantener la integridad del DNA celular.



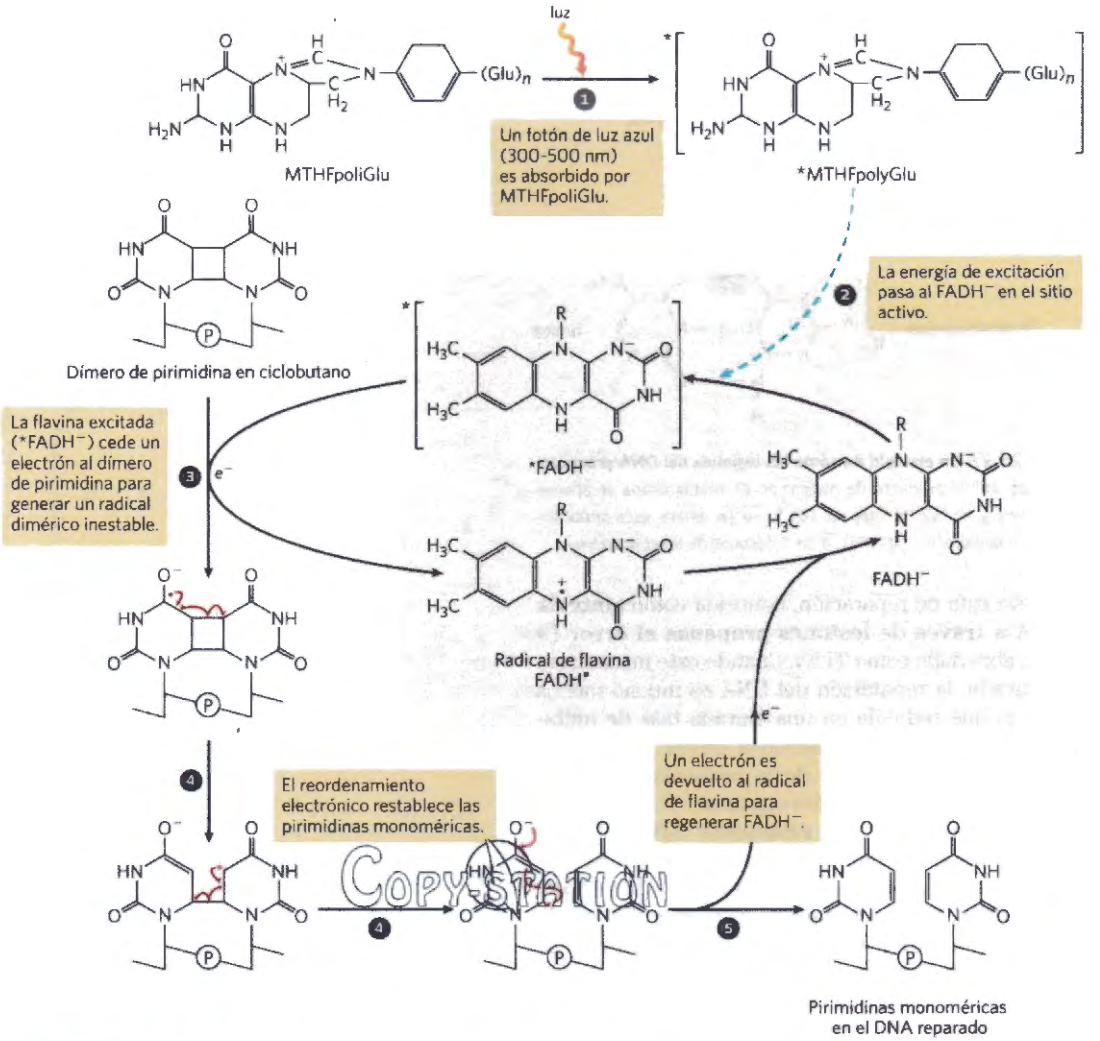


FIGURA MECANISMO 25-26 Reparación de dímeros de pirimidina con fotoliasa. La energía obtenida de la luz absorbida se utiliza para invertir la fotorreacción causante de la lesión. Los dos cromóforos de la fotoliasa de *E. coli* (M_r 54.000), N^5,N^{10}-meteniltetrahidrofolilpoliglutamato (MTHFpoliGlu) y $FADH^-$ tienen funciones complementarias. MTHFpoliGlu actúa de fotoantena que absorbe los fotones de luz azul. La energía de excitación se transfiere al $FADH^-$ y la flavina excitada ($^*FADH^-$) cede un electrón al dímero de pirimidina, provocando el reordenamiento mostrado.

Un mecanismo completamente distinto, pero igualmente directo, se utiliza para reparar la 1-metiladenina y la 3-metilcitosina. Los grupos amino de los residuos de A y C se metilan ocasionalmente en el DNA de cadena sencilla y la metilación afecta directamente el correcto apareamiento de las bases. En *E. coli*, la proteína AlkB, miembro de la superfamilia de la α-cetoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe^{2+} **(Fig. 25-28)**, participa en la desmetilación oxidativa de estos nucleótidos alquilados. (Véase el Recuadro 4-3 para una descripción de otro miembro de esta familia enzimática).

La interacción de las horquillas de replicación con lesiones del DNA puede inducir síntesis de DNA propensa al error a través de la lesión

Las rutas de reparación consideradas hasta este punto generalmente actúan únicamente sobre lesiones en DNA de doble cadena; por tanto, la hebra no dañada puede suministrar la información necesaria para restablecer el estado original de la hebra dañada. Sin embargo, en ciertos tipos de lesiones, tales como las roturas de doble cadena, los entrecruzamientos de doble cadena, o las lesiones en el DNA de cadena sencilla, la hebra complementaria está ella misma dañada o no está disponible. Las roturas de doble cadena y las lesiones en DNA de cadena sencilla aparecen generalmente cuando una horquilla de replicación topa con una lesión no reparada **(Fig. 25-29)**. Este tipo de lesiones y los entrecruzamientos del DNA pueden aparecer también como resultado de radiaciones ionizantes y de reacciones de oxidación.

En una horquilla de replicación bloqueada hay dos posibilidades de reparación. A falta de una segunda hebra, la información requerida para una reparación precisa debe proceder de un cromosoma homólogo distinto. El sistema de reparación es, pues, dependiente de la recombinación genética homóloga. La reparación del DNA por recombinación se examina en detalle en la Sección 25.3. En determinadas condiciones se activa

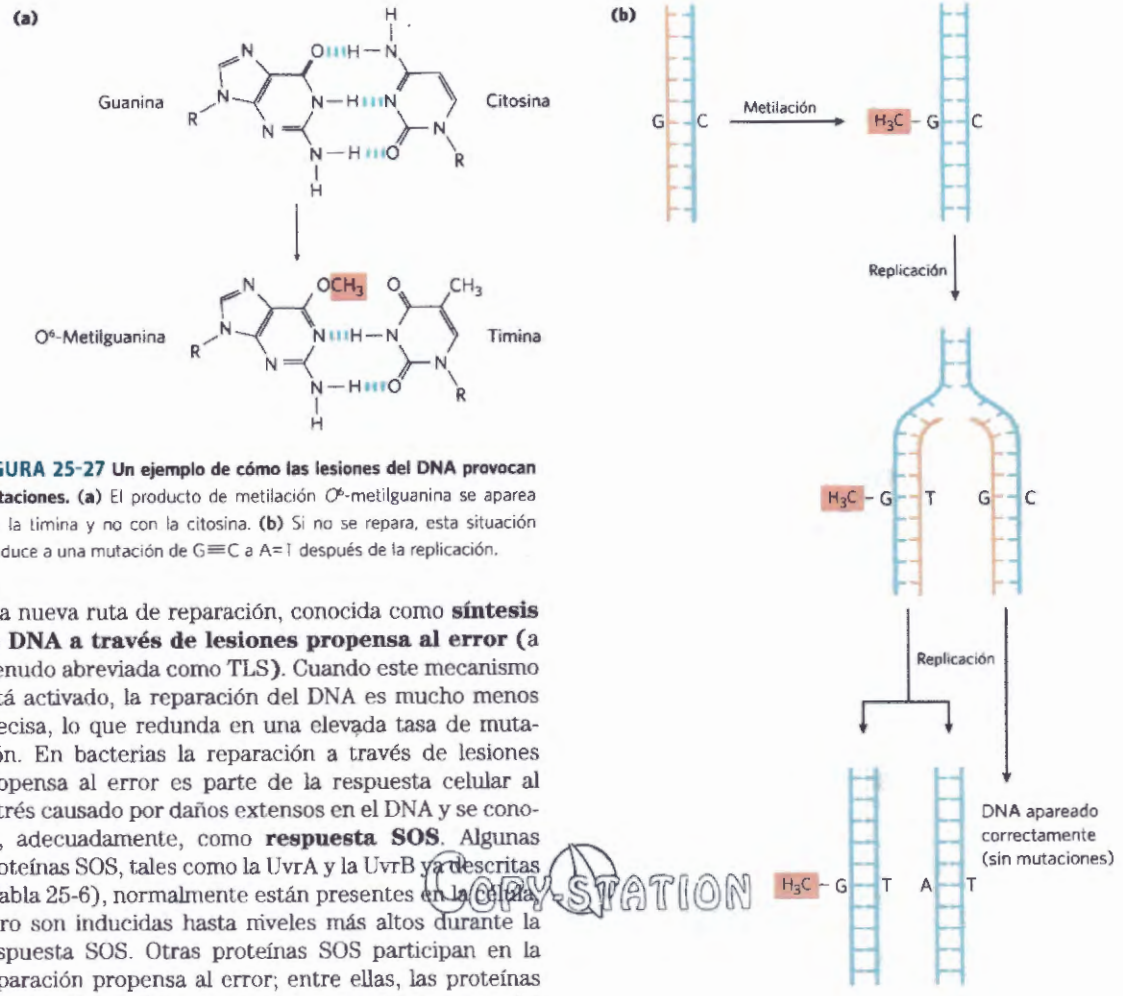


FIGURA 25-27 Un ejemplo de cómo las lesiones del DNA provocan mutaciones. (a) El producto de metilación O^6-metilguanina se aparea con la timina y no con la citosina. **(b)** Si no se repara, esta situación conduce a una mutación de G≡C a A=T después de la replicación.

una nueva ruta de reparación, conocida como **síntesis de DNA a través de lesiones propensa al error** (a menudo abreviada como TLS). Cuando este mecanismo está activado, la reparación del DNA es mucho menos precisa, lo que redunda en una elevada tasa de mutación. En bacterias la reparación a través de lesiones propensa al error es parte de la respuesta celular al estrés causado por daños extensos en el DNA y se conoce, adecuadamente, como **respuesta SOS**. Algunas proteínas SOS, tales como la UvrA y la UvrB ya descritas (Tabla 25-6), normalmente están presentes en la célula, pero son inducidas hasta niveles más altos durante la respuesta SOS. Otras proteínas SOS participan en la reparación propensa al error; entre ellas, las proteínas UmuC y UmuD ("Umu" de no mutable; la ausencia del gen que codifica para *umu* elimina la reparación propensa al error). La proteína UmuD se corta de forma regulada por SOS dando una forma más corta, denominada UmuD', que forma un complejo con la proteína UmuC y una proteína denominada RecA (descrita en la Sección 25.3) y crea una DNA polimerasa especializada, DNA polimerasa V, que puede replicar a través de muchas lesiones que normalmente bloquean la replicación. El apareamiento correcto de las bases es a menu-

COPY-STATION

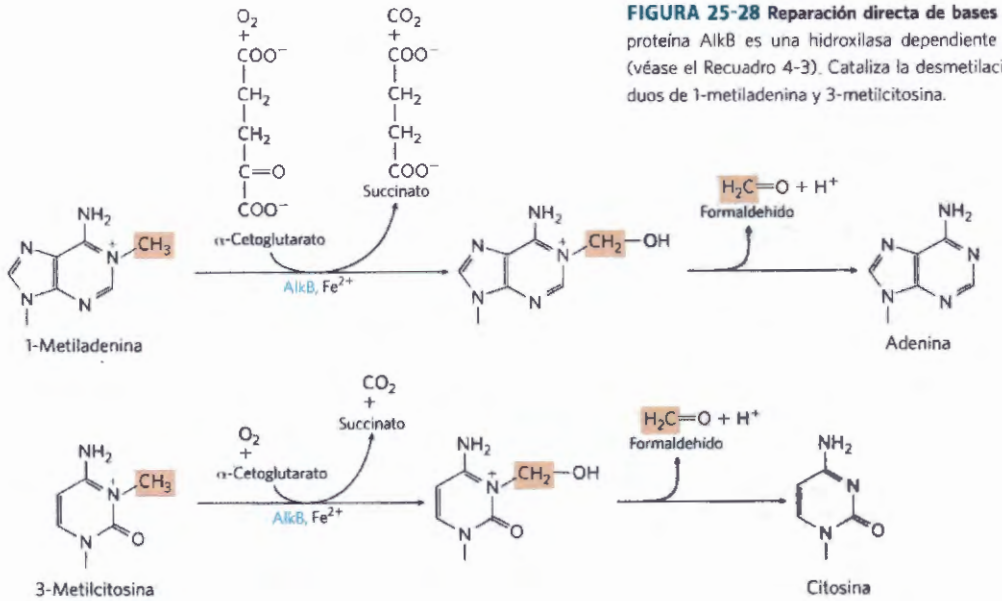


FIGURA 25-28 Reparación directa de bases alquiladas por AlkB. La proteína AlkB es una hidroxilasa dependiente de α-cetoglutarato-Fe^{2+} (véase el Recuadro 4-3). Cataliza la desmetilación oxidativa de los residuos de 1-metiladenina y 3-metilcitosina.

do imposible en el lugar de tales lesiones, por lo que este tipo de replicación a través de lesiones es propenso al error.

En vista del énfasis que se ha puesto en este capítulo sobre la integridad del genoma, un sistema que aumenta la tasa de mutación podría parecer incongruente. Sin embargo, es posible concebir este sistema como una estrategia desesperada. Los genes *umuC* y *umuD* se inducen plenamente sólo en la respuesta SOS tardía y no son activados para la síntesis a través de las lesiones por rotura por UmuD, a menos que los niveles de lesiones en el DNA sean especialmente altos y todas las horquillas de replicación estén bloqueadas. Las mutaciones resultantes de la replicación por la DNA polimerasa V matan algunas células y crean mutaciones deletéreas en otras, pero éste es el precio biológico que un organismo ha de pagar para vencer una barrera, de otro modo infranqueable, para la replicación, y así lograr que sobrevivan al menos unas pocas células hijas mutantes.

Otra polimerasa, la DNA polimerasa IV, es inducida durante la respuesta SOS. La replicación por la DNA polimerasa IV, un producto del gen *din*B, también es muy propensa al error. Las DNA polimerasas IV y V bacterianas (Tabla 25-1) forman parte de una familia de TLS polimerasas presente en todos los organismos. Estos enzimas carecen de actividad exonucleasa correctora de pruebas y poseen un sitio activo más abierto que permite acomodar nucleótidos molde dañados. La fidelidad en la selección de bases durante la replicación puede reducirse en un factor de 10^2, lo que disminuye la fidelidad global en la replicación hasta un error cada ~1000 nucleótidos.

Los mamíferos tienen muchas DNA polimerasas de baja fidelidad pertenecientes a la familia TLS de polimerasas. Sin embargo, la presencia de estas polimerasas no redunda necesariamente en una tasa de mutación inaceptable, pues la mayor parte de estos enzimas también tienen funciones especializadas en la reparación del DNA. Por ejemplo, la DNA polimerasa η (eta), presente en todos los eucariotas, promueve la síntesis a través de dímeros T-T en ciclobutano. En este caso se producen pocas mutaciones porque el enzima inserta preferentemente dos residuos de A en frente de los dos residuos de T unidos. Otras polimerasas de baja fidelidad, entre las que se encuentran las DNA polimerasas β, ι (iota) y λ, tienen funciones especializadas en la reparación por escisión de base eucariótica. Todos estos enzimas tienen una actividad 5'-desoxirribosa fosfato liasa, además de la actividad polimerasa. Después de la eliminación de la base por una glucosilasa y el corte del esqueleto por una AP endonucleasa, estas polimerasas eliminan el sitio abásico (un 5' desoxirribosa fosfato) y llenan el pequeño hueco resultante. La frecuencia de mutaciones debidas a la actividad polimerasa η es reducida a causa de la muy corta longitud (a menudo un solo nucleótido) de DNA sintetizado.

La imagen que surge de las investigaciones sobre los sistemas de reparación de DNA celular que mantienen la integridad genómica consta de múltiples sistemas, a menudo redundantes. En el genoma humano se encuentran más de 130 genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del DNA. En muchos casos, la pérdida de función de una de estas proteínas provoca inestabilidad genómica y un aumento de la incidencia de la oncogénesis (Recuadro 25-1). Estos sistemas de reparación están a menudo integrados con los sistemas de replicación del DNA y se complementan con los sistemas de recombinación que examinaremos a continuación.

RESUMEN 25.2 Reparación del DNA

- Las células tienen muchos sistemas de reparación del DNA. La reparación de desapareamientos en *E. coli* está gobernada por la ausencia transitoria de metilación de las secuencias (5') GATC en la hebra recién sintetizada.
- Los sistemas de reparación por escisión de base reconocen y reparan las lesiones causadas por agentes medioambientales (Tales como la radiación y los agentes alquilantes) y por reacciones espontáneas de los nucleótidos. Algunos sistemas de reparación reconocen y escinden sólo las bases dañadas o incorrectas, dejando un sitio AP (abásico) en el DNA. Este es reparado por escisión y reemplazamiento del segmento de DNA que contiene el sitio AP.
- Los sistemas de reparación por escisión de nucleótido reconocen y eliminan lesiones voluminosas diversas y dímeros de pirimidina. Escinden un segmento de la hebra de DNA que contiene la lesión, dejando un hueco que es rellenado por las actividades DNA polimerasa y ligasa.
- Algunas lesiones del DNA se reparan por inversión directa de la reacción causante del daño: los dímeros de pirimidina se convierten directamente en pirimidinas monoméricas por una fotoliasa y el grupo metilo de la O^6-metilguanina se elimina por una metiltransferasa.
- En las bacterias, la síntesis de DNA a través de la lesión propensa al error, mediante las DNA polimerasas TLS, se produce como respuesta a graves daños en el DNA. En los eucariotas, polimerasas similares tienen funciones especializadas en la reparación del DNA que minimizan la introducción de mutaciones.

25.3 Recombinación del DNA

El reordenamiento de la información genética dentro y entre moléculas de DNA comprende diversos procesos conocidos colectivamente como recombinación genética. Las aplicaciones prácticas de los reordenamientos del DNA en la alteración de los genomas de un número creciente de organismos están siendo exploradas (Capítulo 9).



Barbara McClintock, 1902-1992
[Fuente: AP Photo.]

Los procesos de recombinación genética se dividen en al menos tres clases generales. La **recombinación genética homóloga** (también llamada recombinación general) consiste en el intercambio genético entre dos moléculas de DNA cualesquiera (o segmentos de la misma molécula) que compartan una región extensa de secuencia casi idéntica. La secuencia concreta de bases no es importante, siempre que sea similar en los dos DNA. En la **recombinación específica de sitio** los intercambios sólo tienen lugar en una secuencia de DNA *particular*. La **transposición de**

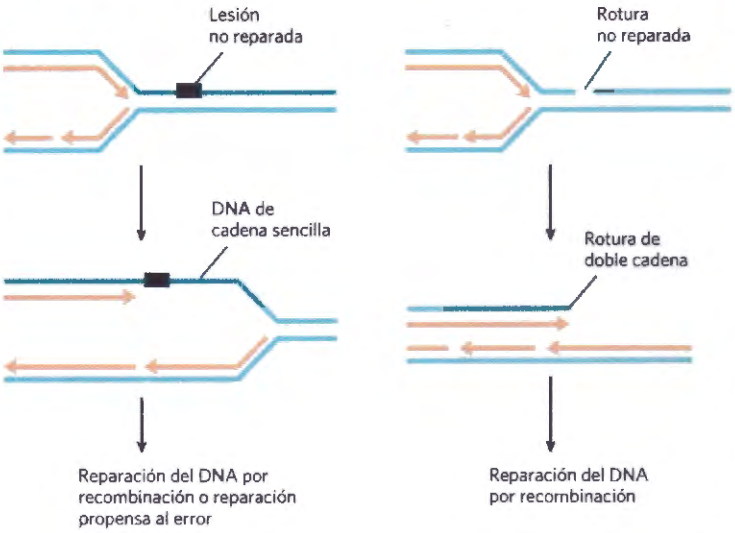


FIGURA 25-29 Efectos de las lesiones del DNA en la replicación. Si la horquilla de replicación encuentra una lesión no reparada o una hebra rota, generalmente se detiene la replicación con lo que la horquilla puede colapsarse. Una lesión queda atrás en un segmento monohebra (izquierda) sin replicar; una rotura de cadena sencilla se convierte en una rotura de cadena doble (derecha). En ninguno de estos casos el daño puede ser reparado por los mecanismos estudiados anteriormente, porque la hebra complementaria, necesaria para la reparación directa, está dañada o no existe. En estos casos hay dos vías posibles para la reparación: la reparación del DNA por recombinación (descrita en la Fig. 25-30) o, cuando las lesiones son muy numerosas, la replicación propensa al error. Este último mecanismo de reparación utiliza una nueva polimerasa (DNA polimerasa V, codificada por los genes *umuC* y *umuD* y activado por la proteína RecA), que puede replicar, aunque de forma imprecisa, por encima de muchos tipos de lesiones. Se denomina reparación "propensa al error" porque a menudo provoca mutaciones.

DNA es diferente de las otras dos clases, pues normalmente interviene un segmento corto de DNA con la notable capacidad de trasladarse de un lugar a otro del cromosoma. Estos "genes saltadores" fueron observados por vez primera en el maíz en la década de 1940 por Barbara McClintock. Además de estas tres clases bien caracterizadas, hay una amplia gama de reordenamientos poco frecuentes para los que aún no se ha propuesto ni mecanismo ni finalidad. Nos ceñiremos sólo a las tres clases generales.

TABLA 25-6 Genes inducidos como parte de la respuesta SOS en *E. coli*

Nombre del gen	Proteína codificada y/o papel en la reparación del DNA
Genes de función conocida	
polB (*dinA*)	Codifica la subunidad polimerizante de la DNA polimerasa II, requerida para el reinicio de la replicación en la reparación del DNA por recombinación
uvrA *uvrB*	Codifican las subunidades UvrA y UvrB de la ABC excinucleasa
umuC *umuD*	Codifican las subunidades núcleo y de polimerización de la DNA polimerasa V
sulA	Codifica una proteína que inhibe la división celular, posiblemente para dar tiempo a la reparación del DNA
recA	Codifica la proteína RecA requerida para la reparación propensa al error y para la reparación por recombinación
dinB	Codifica la DNA polimerasa IV
dinD	Codifica la proteína que inhibe la función recombinasa de RecA
ssb	Codifica la proteína de unión a DNA de hebra sencilla (SSB)
himA	Codifica la subunidad del factor de integración del huésped (IHF), implicado en la recombinación específica de sitio, la replicación, la transposición, la regulación de la expresión génica
Genes que intervienen en el metabolismo del DNA pero cuyo papel en la reparación del DNA es desconocido	
uvrD	Codifica la DNA helicasa II (proteína desenrolladora del DNA)
recN	Necesario para la reparación por recombinación
Genes de función desconocida	
dinB	

COPY-STATION

Nota: algunos de estos genes y sus funciones se discuten más ampliamente en el Capítulo 28.

La recombinación genética homologa es en gran parte un mecanismo para reparar las roturas de doble cadena en el DNA. Un sistema alternativo para la reparación de las rupturas de la doble cadena del DNA, llamado la **unión de extremos no homologos (NHEJ),** también será descrita en este apartado. Las funciones de los sistemas de recombinación genética son tan variadas como sus mecanismos. Participan en sistemas de reparación del DNA especializados, en la replicación del DNA, en la regulación de la expresión de ciertos genes, también contribuyen a la segregación correcta de los cromosomas durante la división celular en los eucariotas, en el mantenimiento de la diversidad genética y en los reordenamientos genéticos programados durante el desarrollo embrionario. En general, la recombinación genética está íntimamente integrada con otros procesos del metabolismo del DNA, tal como veremos a continuación.

RECUADRO 25-1 MEDICINA Reparación del DNA y Cáncer

El cáncer humano se desarrolla cuando ciertos genes que regulan la división celular normal (oncogenes y genes supresores de tumores; Capítulo 12) dejan de funcionar, se activan en el momento incorrecto o están alterados. Las células pueden entonces crecer fuera de control y formar un tumor. Los genes que controlan la división celular pueden ser dañados por mutaciones espontáneas o anulados por la invasión de un virus tumoral (Capítulo 26). No es, pues, sorprendente que las alteraciones de los genes de reparación del DNA, que redundan en un aumento de la tasa de mutación, puedan aumentar considerablemente la susceptibilidad individual al cáncer. Los defectos en los genes que codifican las proteínas implicadas en la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación de apareamientos incorrectos, la reparación por recombinación y en la síntesis translesión del DNA propensa al error se han asociado todos ellos con el cáncer humano. Sin duda, la reparación del DNA puede ser un asunto de vida o muerte.

La reparación por escisión de nucleótidos requiere un mayor número de proteínas en el hombre que en las bacterias, aunque las rutas generales sean muy similares. Los defectos genéticos que inactivan la reparación por escisión de nucleótidos han sido asociados con varias enfermedades genéticas, de las que la mejor estudiada es el xeroderma pigmentosum, (XP). La reparación por escisión de nucleótidos es la única ruta para la reparación de los dímeros de pirimidina en el hombre; por ello, quienes están aquejados de XP son extremadamente sensibles a la luz y desarrollan fácilmente cánceres de piel por exposición a la luz solar. La mayoría de pacientes de XP también presentan anomalías neurológicas, presumiblemente por su incapacidad para reparar ciertas lesiones causadas por la elevada tasa del metabolismo oxidativo de las neuronas. Los defectos en los genes que codifican cualquiera de los al menos siete componentes proteicos diferentes del sistema de reparación por escisión de nucleótido pueden provocar el XP, originando siete grupos genéticos diferentes designados desde XPA a XPG. Varias de estas proteínas (en particular las defectuosas en XPB, XPD y XPG) también participan en la reparación por escisión de base asociada a la transcripción de lesiones oxidativas, descrita en el Capítulo 26. Observar que las XPC y XPE forman parte del complejo que reconoce el DNA dañado, mientras que XPA, XPB, XPD, XPF y XPG son todos componentes de un complejo mucho más grande formado por multiplesubunidades que representa la excinucleasa humana mostrada en la figura 25-25. Estas proteínas están involucradas en el proceso de corte y eliminación del fragmento de DNA de 29 nucleotidos (29mer).

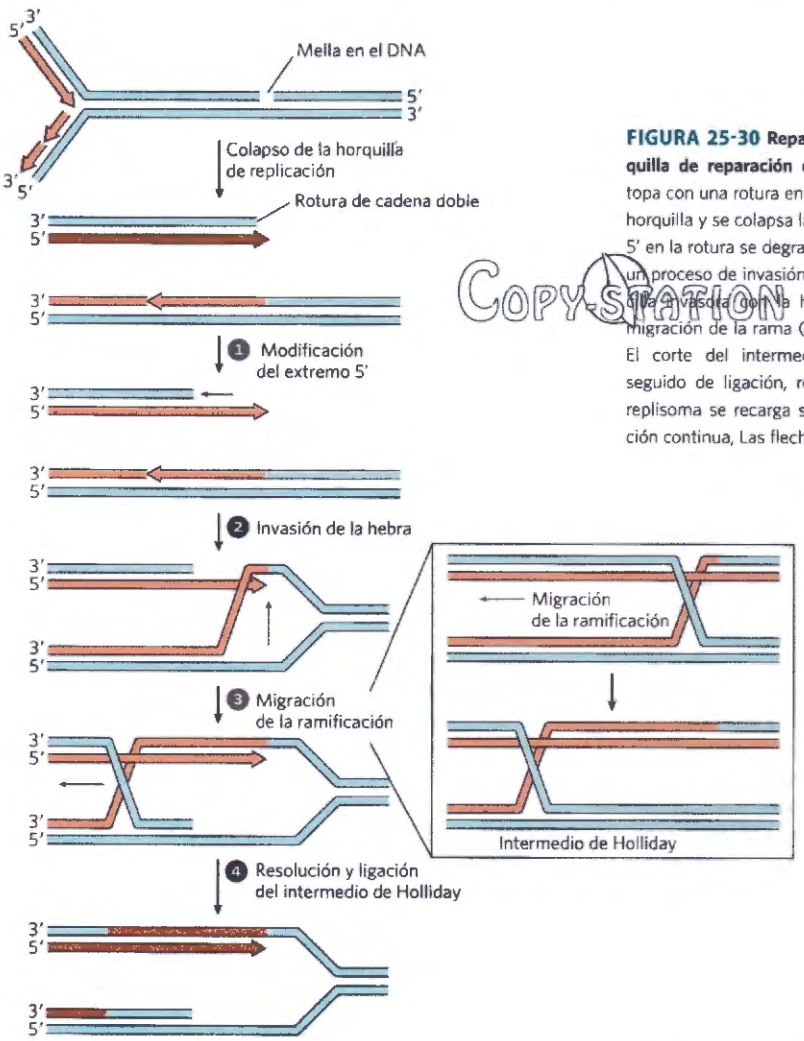
La mayoría de microorganismos tienen rutas redundantes para la reparación de los dímeros de pirimidina en ciclobutano, que usan DNA fotoliasas y a veces reparación por escisión de base como alternativas a la reparación por escisión de nucleótidos, pero los humanos y otros mamíferos placentarios no los poseen. La falta de sistemas de apoyo de la reparación por escisión de nucleótido para la eliminación de los dímeros de pirimidina ha planteado la posibilidad que los primeros mamíferos fuesen velludos y de hábitos nocturnos y, por tanto, con pocas necesidades de reparar daños por luz UV. Sin embargo, los mamíferos sí tienen una ruta para la reparación de los dímeros de pirimidina en ciclobutano a través de la lesión, basado en la DNA polimerasa η. Este enzima inserta preferentemente dos residuos de A en frente del dímero T-T de pirimidina, minimizando así las mutaciones. Los individuos afectados por una dolencia genética caracterizada por la falta de actividad DNA polimerasa η desarrollan una enfermedad del tipo del XP conocida por variante XP o XP-V. Las manifestaciones clínicas de la XP-V son similares a las del XP clásico, pero con niveles de mutación más altos cuando la piel se expone a la luz UV. Aparentemente, el sistema de reparación por escisión de nucleótido actúa conjuntamente con la DNA polimerasa η en las células humanas normales, reparando y/o ignorando los dímeros de pirimidina según convenga para mantener el crecimiento celular y la replicación del DNA. La exposición a la luz UV produce un gran número de dímeros de pirimidina que obliga a que algunos sean ignorados por la síntesis a través de la lesión para mantener la replicación en funcionamiento. La carencia de cualquiera de los dos sistemas es compensada por el otro. La pérdida de actividad DNA polimerasa η provoca el bloqueo de las horquillas de replicación y obliga a ignorar las lesiones por luz UV, recurriendo a las polimerasas de síntesis a través de la lesión (TLS) que son más mutagénicas. Como sucede cuando otros sistemas de reparación del DNA no son funcionales, el aumento resultante de la tasa de mutación a menudo provoca cáncer.

COPYSTATION

RECUADRO 25-1 MEDICINA Reparación del DNA y Cáncer (continuación)

Uno de los síndromes de susceptibilidad al cáncer más comunes es el cáncer de colon hereditario no formador de pólipos, o HNPCC. Este síndrome ha sido relacionado con defectos en la reparación de apareamientos incorrectos. Las células eucarióticas, entre ellas las humanas, poseen varias proteínas análogas a la bacterianas MutL y MutS (véase la Fig. 25-22). Defectos en al menos cinco genes de reparación de apareamientos incorrectos pueden causar HNPCC. Los más abundantes afectan a los genes *hMLH1* (homólogo 1 humano de MutL) y *hMSH2* (homólogo 2 humano de MutL). En los individuos con HNPCC, el cáncer generalmente se desarrolla a una edad temprana, con elevada incidencia de cánceres de colon.

La mayoría de cánceres de mama humanos afectan a mujeres sin predisposición conocida. Sin embargo, aproximadamente un 10% de los casos están asociados a defectos heredados en dos genes, *BRCA1* y *BRCA2*. BRCA1 y BRCA2b humanas son proteínas de gran tamaño (1834 y 3418 residuos aminoácidos, respectivamente). Ambas interaccionan con otras muchas proteínas implicadas en la transcripción, el mantenimiento de los cromosomas, la reparación del DNA y el control del ciclo celular. BRCA2 se ha asociado con la reparación por recombinación de roturas de doble cadena en el DNA. Sin embargo, la función molecular precisa de BRCA1 y BRCA2 en estos diversos procesos celulares todavía no está clara. Las mujeres con defectos en el gen *BRCA1* o en el *BRCA2* tienen una probabilidad superior al 80% de desarrollar cáncer de mama.



COPY-STATION

FIGURA 25-30 Reparación del DNA por recombinación en una horquilla de reparación colapsada. Cuando una horquilla de replicación topa con una rotura en una de las hebras molde, se pierde un brazo de la horquilla y se colapsa la horquilla de replicación. La hebra con el extremo 5′ en la rotura se degrada para crear una extensión en 3′ que se usa para un proceso de invasión de la cadena, con apareamiento de la hebra sencilla invasora con la hebra complementaria del dúplex adyacente. La migración de la rama (recuadro) puede crear un intermedio de Holliday. El corte del intermedio de Holliday por nucleadas especializadas, seguido de ligación, restablece una horquilla de replicación viable. El replisoma se recarga sobre esta estructura (no mostrado) y la replicación continua, Las flechas indican los extremos 3′.

La recombinación homóloga en las bacterias es un proceso de reparación del DNA

En las bacterias, la recombinación genética homóloga es, básicamente, un proceso de reparación del DNA y en este contexto se denomina **reparación del DNA por recombinación** (tal como se indica en la Sección 25.2). Actúa normalmente en la reconstrucción de horquillas de replicación bloqueadas o colapsadas en las lesiones del DNA. La recombinación genética homóloga

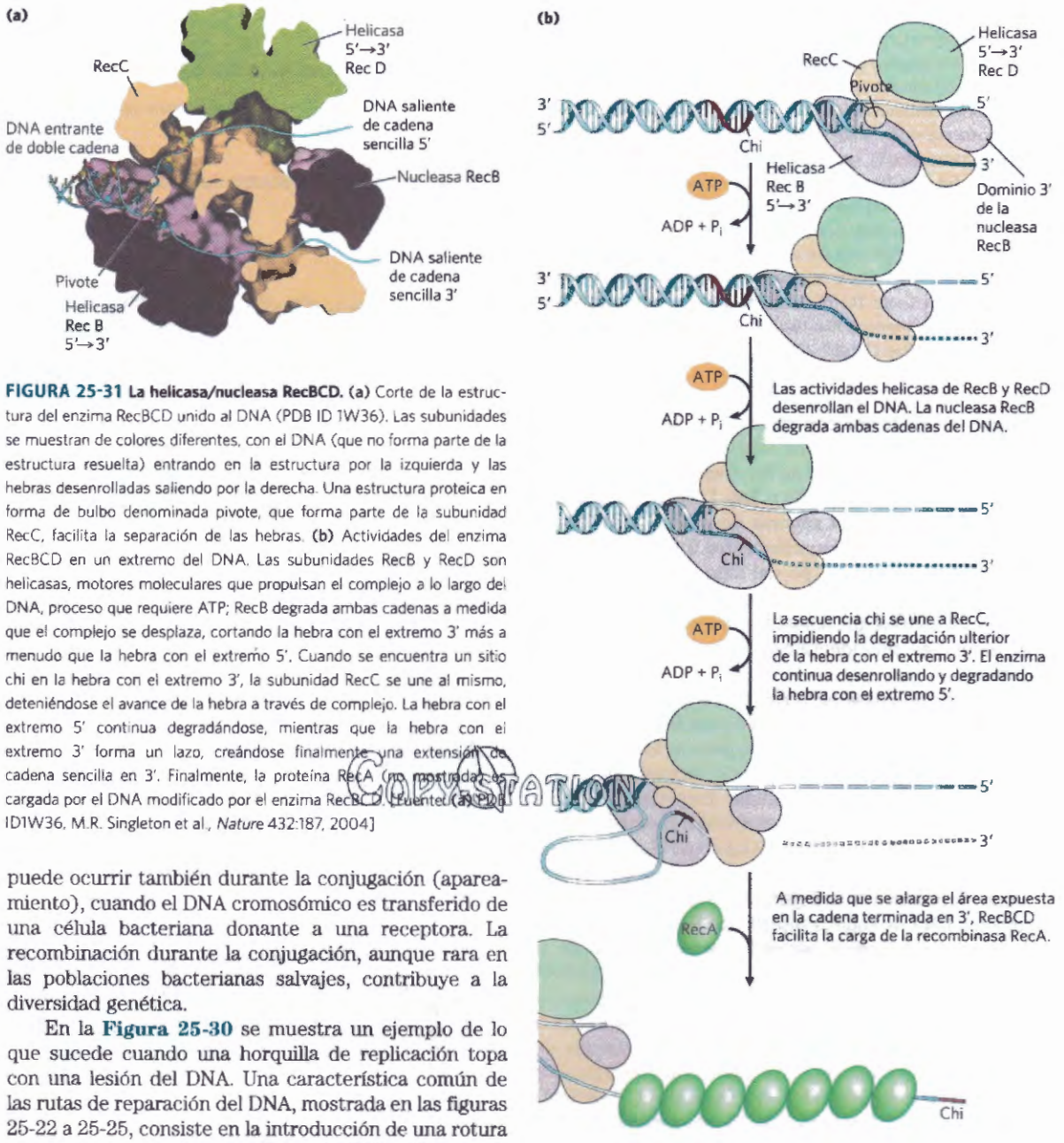


FIGURA 25-31 La helicasa/nucleasa RecBCD. (a) Corte de la estructura del enzima RecBCD unido al DNA (PDB ID 1W36). Las subunidades se muestran de colores diferentes, con el DNA (que no forma parte de la estructura resuelta) entrando en la estructura por la izquierda y las hebras desenrolladas saliendo por la derecha. Una estructura proteica en forma de bulbo denominada pivote, que forma parte de la subunidad RecC, facilita la separación de las hebras. **(b)** Actividades del enzima RecBCD en un extremo del DNA. Las subunidades RecB y RecD son helicasas, motores moleculares que propulsan el complejo a lo largo del DNA, proceso que requiere ATP; RecB degrada ambas cadenas a medida que el complejo se desplaza, cortando la hebra con el extremo 3' más a menudo que la hebra con el extremo 5'. Cuando se encuentra un sitio chi en la hebra con el extremo 3', la subunidad RecC se une al mismo, deteniéndose el avance de la hebra a través de complejo. La hebra con el extremo 5' continua degradándose, mientras que la hebra con el extremo 3' forma un lazo, creándose finalmente una extensión de cadena sencilla en 3'. Finalmente, la proteína RecA (no mostrada) es cargada por el DNA modificado por el enzima RecBCD. [Fuente (a): PDB ID1W36, M.R. Singleton et al., *Nature* 432:187, 2004.]

COPYSTATION

puede ocurrir también durante la conjugación (apareamiento), cuando el DNA cromosómico es transferido de una célula bacteriana donante a una receptora. La recombinación durante la conjugación, aunque rara en las poblaciones bacterianas salvajes, contribuye a la diversidad genética.

En la **Figura 25-30** se muestra un ejemplo de lo que sucede cuando una horquilla de replicación topa con una lesión del DNA. Una característica común de las rutas de reparación del DNA, mostrada en las figuras 25-22 a 25-25, consiste en la introducción de una rotura transitoria en una de las cadenas de DNA. Si una horquilla de replicación encuentra un sitio dañado que está siendo reparado cerca de una rotura en una de las hebras molde, uno de los brazos de la horquilla de replicación resulta desconectado por una rotura de doble cadena y la horquilla colapsa. El extremo de la rotura se procesa degradando la hebra con el extremo 5'. La extensión de cadena sencilla con el extremo 3' se une a una recombinasa que promueve que el extremo 3' libre invada el DNA dúplex intacto conectado al otro brazo de la horquilla y se aparee con su secuencia complementaria. Ello crea una estructura de DNA ramificada (un punto donde se juntan tres segmentos de DNA). La rama del DNA puede desplazarse mediante un proceso denominado **migración de la ramificación** que crea una estructura entrecruzada en X, llamada **intermedio de Holliday,** denominada así por el investigador Robin Holliday que fue el primero que postuló su existencia. El intermedio de Holliday se resuelve a continuación por una clase especial de nucleasa. El proceso en su conjunto reconstruye la horquilla de replicación.

En *E. coli*, el procesado final del DNA corre a cargo de la nucleasa/helicasa RecBCD que se une al DNA lineal en un extremo libre (roto) y se mueve hacia adentro a lo largo de la doble hélice, desenrollando y degradando el DNA, en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP **(Fig. 25-31)**. Las subunidades RecB y RecD son motores helicasa; RecB se mueve en dirección 3'→ 5' a lo largo de una cadena y RecD se mueve en dirección 5' → 3' a lo largo de la otra cadena. La actividad del enzima se altera cuando interacciona con una secuencia denominada **chi**, (5')GCTGGTGG(3') que se une firmemente a un sitio de la subunidad RecC. A partir de este punto, la degradación de la hebra con el extremo 3' disminuye considerablemente, pero aumenta la degra-

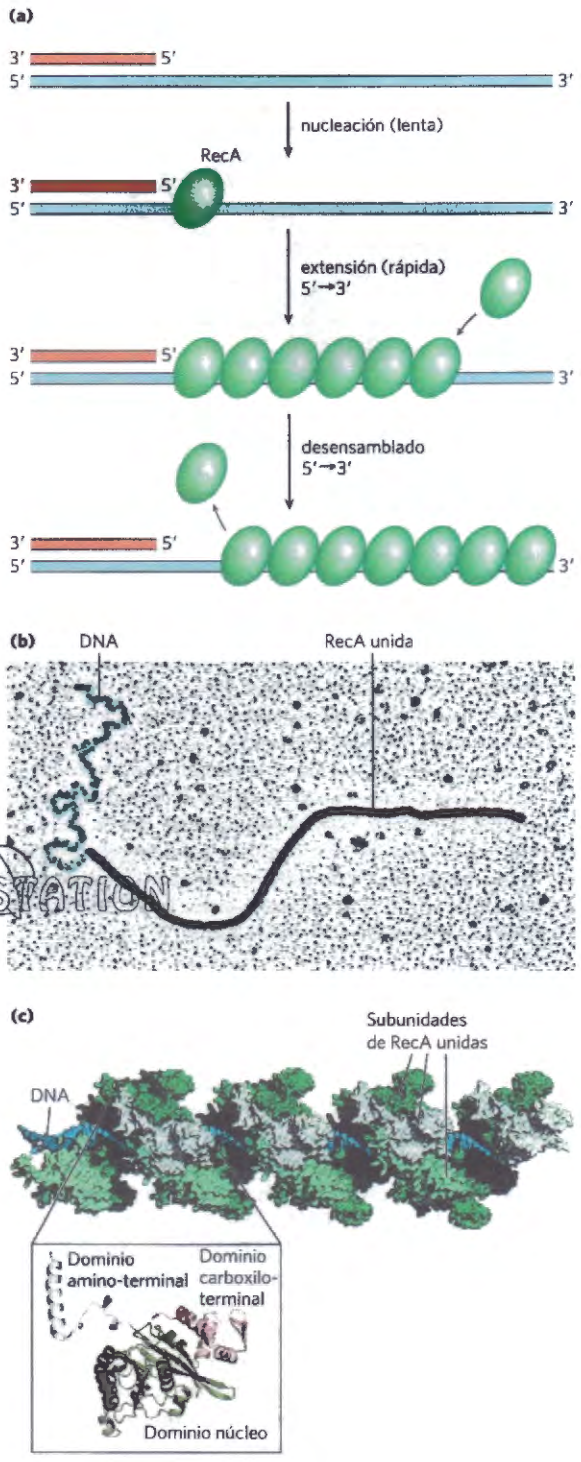


FIGURA 25-32 Filamentos de Proteína RecA. RecA y otras recombinasas de su clase forman filamentos de nucleoproteína. **(a)** La formación de filamentos progresa por etapas discretas de nucleación y extensión. La nucleación consiste en la adición inicial de unas pocas subunidades de RecA. La extensión se produce por adición de subunidades de RecA, de manera que el filamento crezca en dirección 5′→ 3′. Cuando se produce el desagregación, las subunidades se pierden desde el extremo posterior. **(b)** Microfotografía electrónica coloreada de un filamento de RecA unido a DNA. **(c)** Segmento de un filamento de RecA con cuatro vueltas helicoidales (24 subunidades de RecA, tomado de PDB ID 3CMX). Observe el DNA de doble cadena unido en el centro. El dominio núcleo de RecA está relacionado estructuralmente con los dominios de las helicasas. [Fuente: **(b)** con el permiso de los herederos de Ross Inman. Agradecimientos a Kim Vass. **(c)** Modificado de PDB ID 3CMX, Z Chen et al., *Nature* 453:489, 2008.]

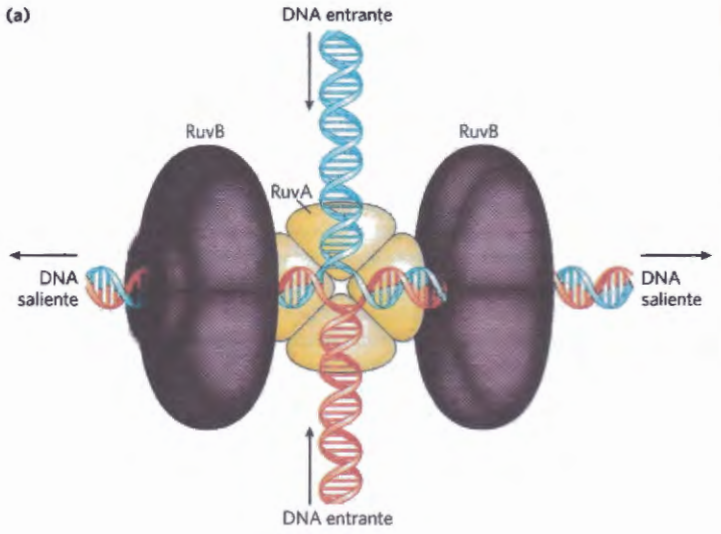
dación de la hebra con el extremo 5'. Este proceso genera un DNA de cadena sencilla con un extremo 3', estructura que se utiliza en las etapas posteriores de la recombinación (Fig. 25-33). Las 1.009 secuencias chi dispersas por todo el genoma de *E. coli* aumentan la frecuencia de recombinación entre 5 y 10 veces hasta una distancia de 1000 pb del sitio chi. Este aumento disminuye cuando la distancia del sitio chi aumenta. Otras secuencias que aumentan la frecuencia de recombinación han sido identificadas también en otros organismos.

La recombinasa bacteriana es la proteína RecA. La proteína RecA destaca entre las proteínas que intervienen en el metabolismo del DNA, pues su forma activa es un filamento helicoidal ordenado formado por varios millares de subunidades unidas cooperativamente al DNA **(Fig. 25-32)**. Este filamento normalmente se forma sobre DNA monohebra, tal como el generado por el enzima RecBCD. Su formación no es tan sencilla como se muestra en la Figura 25-32, pues la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) está normalmente presente e impide específicamente la unión de las primeras subunidades al DNA (nucleación del filamento). El enzima RecBCD actúa directamente como un factor de carga de RecA, facilitando la nucleación de un filamento de RecA sobre DNA de cadena sencilla que esté recubierto de SSB. Los filamentos se juntan y se separan en la dirección 5' → 3'. Otras muchas proteínas bacterianas regulan la formación y la separación de los filamentos de RecA. La proteína RecA facilita las etapas principales de la recombinación homóloga, incluida la invasión de la hebra de la figura 25-30 y otras reacciones de intercambio de hebras in vitro.

Una vez completada la invasión de la hebra, la migración de la ramificación es facilitada por un complejo denominado RuvAB **(Fig. 25-33a)**. Una vez creado el intermedio de Holliday, éste puede ser cortado por una nucleasa especializada denominada RuvC (Fig. 25-33b) y las mellas reparadas por la DNA ligasa. De esta manera se reconstruye una estructura viable de la horquilla de replicación, tal como se muestra en la Figura 25-30.

Una vez completadas las etapas de la recombinación, la horquilla de replicación se reorganiza en un proceso denominado **reiniciación independiente de origen de la replicación.** Cuatro proteínas (PriA, PriB, PriC y DnaT) actúan junto con DnaC para cargar la DnaB helicasa en la horquilla de replicación reconstruida. A continuación, la DnaG primasa sintetiza un cebador de RNA y la DNA polimerasasa III se une de nuevo sobre DnaB para reanudar la síntesis de DNA. El complejo de PriA, PriB, PriC y DnaT, junto con DnaB, DnaC y DnaGse denomina **primosoma de reinicio de la replicación**. De esta manera, el proceso de recombinación está estrechamente entrelazado con la replicación. Ambos procesos del metabolismo del DNA se apoyan mutuamente.

COPY-STATION



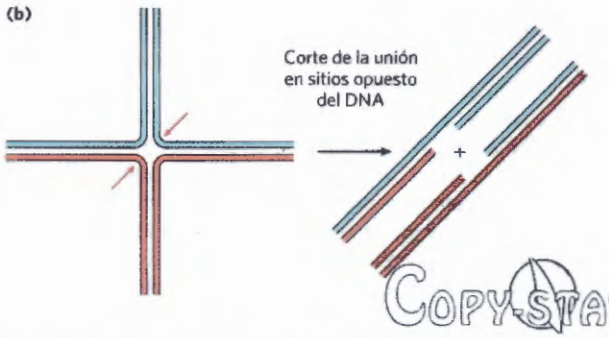


FIGURA 25-33 Catálisis de la migración de rama del DNA y resolución del intermedio de Holliday por las proteínas RuvA, RuvB y Ruv C. **(a)** La proteína Ruv A se une directamente a un intermedio de Hollyday donde coinciden los cuatro brazos de DNA. La proteína hexamérica RuvB es una DNA translocasa. Dos hexámeros se unen a brazos opuestos del intermedio de Holliday y propulsan el DNA hacia el exterior en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP. La rama se mueve de este modo. **(b)** RuvC es una nucleasa especializada que se une al complejo RuvAB y corta el intermedio de Holliday en lados opuestos de la unión (flechas rojas) de manera que quedan dos brazos de DNA contiguos en cada producto.

COPY-STATION

La recombinación homóloga eucariótica es necesaria para la correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis

En los eucariotas, la recombinación genética homóloga puede desempeñar diversos papeles en la replicación y en la división celular, entre los que se encuentra la reparación de horquillas de replicación bloqueadas. La recombinación ocurre con la máxima frecuencia durante la **meiosis**, proceso mediante el cual una célula germinal diploide con dos conjuntos de cromosomas se divide para producir gametos haploides (células espermáticas u óvulos) en los animales (esporas haploides en la plantas), cada uno de los cuales sólo tiene un miembro de cada pareja de cromosomas **(Fig. 25-34)**. La meiosis empieza con la replicación del DNA en las células de la línea germinal, de modo que cada célula contiene cuatro copias de las moléculas de DNA. Cada conjunto de cuatro cromosomas homólogos (tétrada) se presenta como dos pares de cromátidas hermanas, cada una de las cuales permanece asociada a sus centrómero. La célula experimenta seguidamente dos divisiones sucesivas sin replicación del DNA. En la primera división celular, los dos pares de cromátidas hermanas segregan en las células hijas. En la segunda división celular, los dos cromosomas de cada par de cromátidas hermanas se segregan entre las nuevas células hijas. En cada división, los cromosomas que se han de segregar son arrastrados hacia las células hijas por fibras del huso unidas a los polos opuestos de las células en división. Las dos divisiones sucesivas reducen el contenido de DNA de los gametos hasta el nivel haploide. La segregación correcta de los cromosomas entre las células hijas requiere la existencia de uniones físicas entre los cromosomas homólogos que se han de segregar. Cuando las fibras del huso se unen a los centrómeros de los cromosomas y empiezan a tirar, los enlaces entre los cromosomas homólogos crean tensión. Esta tensión, detectada por mecanismos celulares todavía desconocidos, indica que este par de cromosomas o de cromátidas hermanas está correctamente alineado para la segregación. Una vez detectada la tensión, los enlaces desaparecen gradualmente y se produce la segregación. Si se produce la unión incorrecta de las fibras del huso (p.e., si los centrómeros de un par de cromosomas están unidos al mismo polo celular) una quinasa celular detecta la falta de tensión y activa un sistema que elimina las uniones al huso, para hacer posible un nuevo intento.

Durante la segunda división meiótica, la unión al centrómero de las cromátidas hermanas, reforzada por las cohesinas depositadas durante la replicación (véase la Fig. 24-34), suministran las uniones físicas necesarias para guiar la segregación. Sin embargo, durante la primera división meiótica los dos pares de cromátidas hermanas que deben segregarse no están relacionadas por un proceso de replicación reciente ni están unidas por cohesinas o por cualquier otro tipo de asociación física. En su lugar, los pares homólogos de cromátidas hermanas se alinean y se crean nuevos enlaces por recombinación, proceso que implica la rotura y el empalme del DNA **(Fig. 25-35)**. Este intercambio, denominado también entrecruzamiento, puede ser

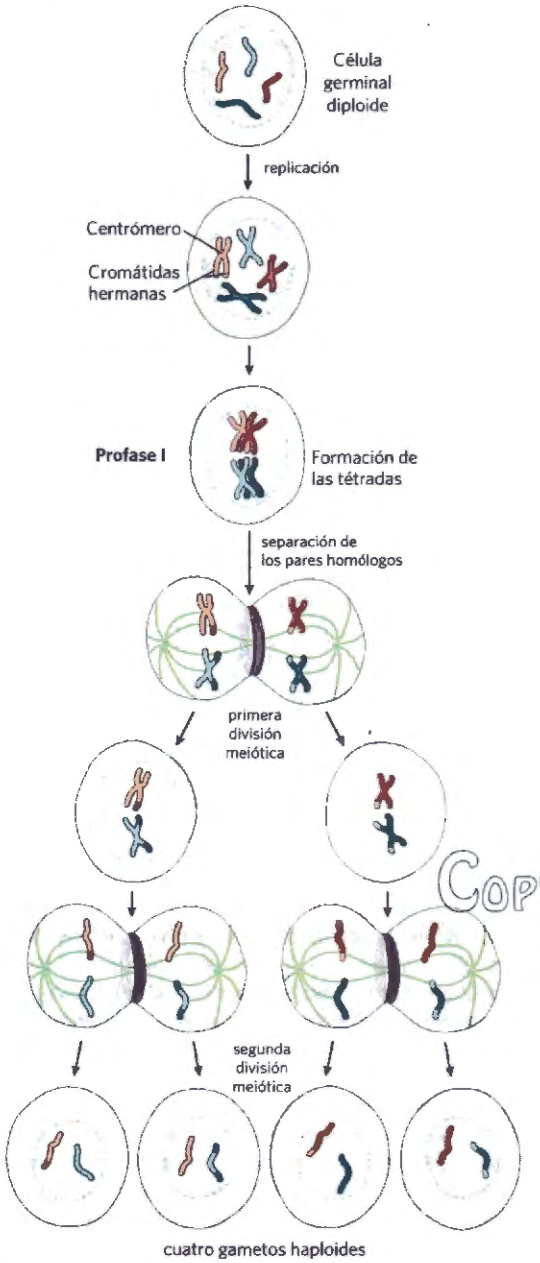


FIGURA 25-34 Meiosis en células germinales animales. Los cromosomas de una hipotética célula germinal diploide (cuatro cromosomas; dos pares homólogos) se replican y se mantienen unidos por sus centrómeros. Las moléculas de DNA de doble cadena replicadas se denominan cromátidas (cromátidas hermanas). En la profase I, inmediatamente antes de la primera división meiótica, los dos conjuntos homólogos de cromátidas se alinean formando tétradas, unidas por enlaces covalentes en uniones homólogas (quiasmas). Los entrecruzamientos tienen lugar dentro de los quiasmas (véase la Fig. 25-35). Estas asociaciones transitorias entre homólogos aseguran la segregación correcta de los dos cromosomas unidos hacia los polos opuestos en el paso siguiente, cuando los pares homólogos unidos a fibras del huso se separan y migran hacia polos opuestos de la célula en la primera división meiótica. Los productos de esta división son dos células hijas, cada una con dos pares de cromátidas hermanas. Los pares homólogos se alinean en el ecuador de la célula como preparación para la separación de las cromátidas (que ahora se denominan cromosomas). La segunda división meiótica produce cuatro células hijas haploides, que pueden servir de gametos. Cada una tiene dos cromosomas, la mitad de los que tiene la célula germinal diploide. Los cromosomas se han vuelto a segregar y se han recombinado.

observado con el microscopio óptico. El entrecruzamiento une los dos pares de cromátidas hermanas en puntos denominados quiasmas. Durante el entrecruzamiento también se intercambia material genético entre los pares de cromátidas hermanas. Estos intercambios también aumentan la diversidad genética de los gametos resultantes. La importancia de la recombinación meiótica para la correcta segregación de los cromosomas está bien ilustrada por las consecuencias fisiológicas y sociales derivadas de su fracaso (Recuadro 25-2)

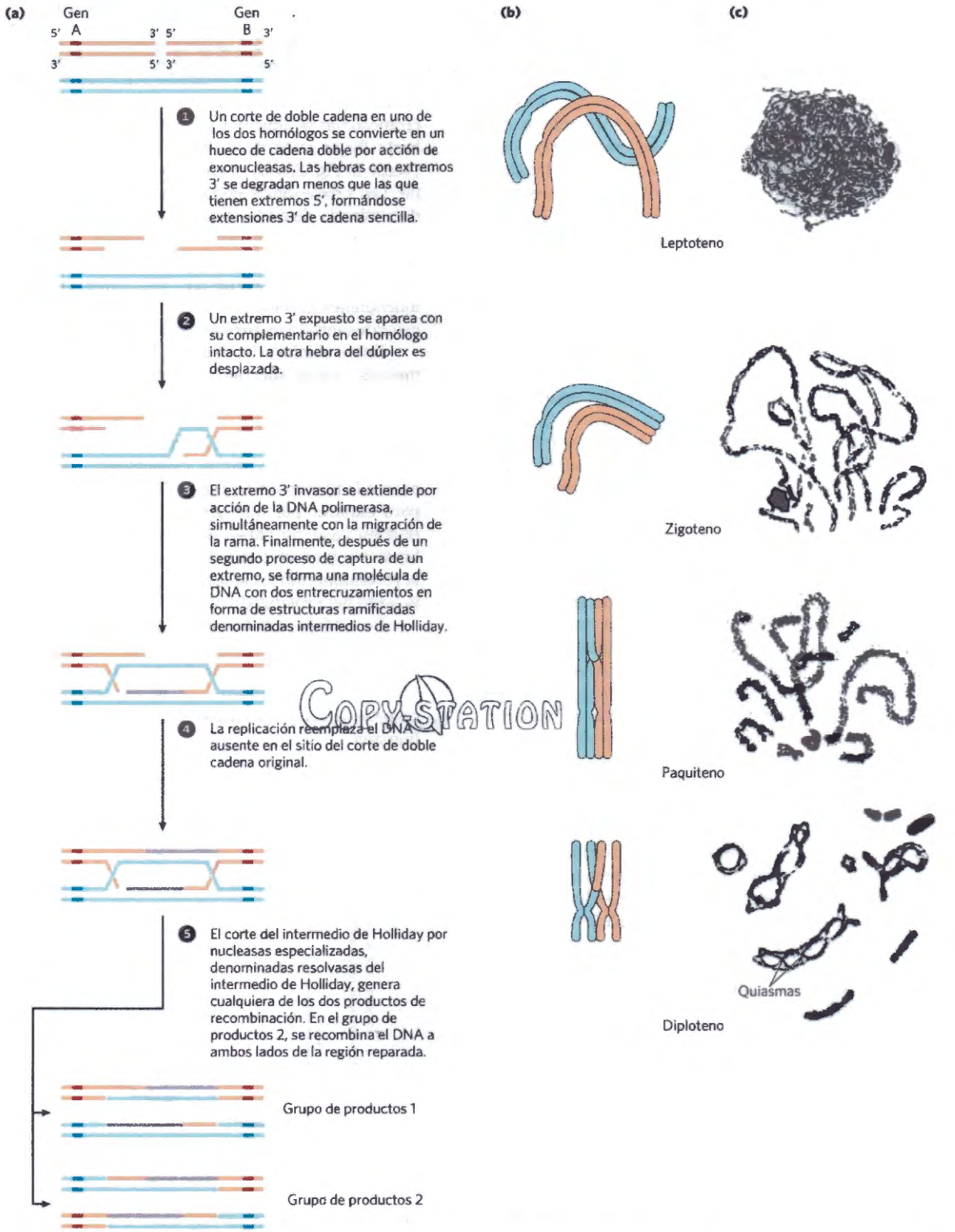
El entrecruzamiento no es un proceso enteramente al azar, pues se han detectado lugares con alta probabilidad de entrecruzamiento en muchos cromosomas eucarióticos. Sin embargo, la suposición de que la recombinación homóloga ocurre con igual probabilidad en casi cualquier punto a lo largo de la longitud de dos cromosomas homólogos sigue siendo una aproximación razonable en muchos casos. Esta suposición hace posible el cartografiado de los genes de un cromosoma concreto. La frecuencia de recombinación homóloga en cualquier región que separe dos puntos de un cromosoma es aproximadamente proporcional a la distancia entre los puntos, lo cual permite determinar las posiciones relativas y las distancias entre diferentes genes. El agrupamiento independiente de genes no ligados en diferentes cromosomas **(Fig. 25-36)** representa otra contribución importante a la diversidad genética de los gametos. Estos fenómenos genéticos están detrás de muchas de las aplicaciones modernas de la genómica, tales como la definición de haplotipos (véase la Fig. 9-28) o la búsqueda de genes asociados a enfermedades en el genoma humano (véase la Fig. 9-32).

La recombinación homóloga tiene pues al menos tres funciones conocidas en los eucariotas: (1) contribuye a la reparación de varios tipos de lesiones del DNA; (2) en las células eucarióticas, proporciona una unión física transitoria entre las cromátidas que es necesaria para la segregación ordenada de los cromosomas en la primera división celular meiótica, y (3) aumenta la diversidad genética de una población.

COPY-STATION

La recombinación durante la meiosis se inicia en roturas de cadena doble

En la Figura 25-35a se esquematiza una ruta probable para la recombinación homóloga durante la meiosis. El modelo tiene cuatro características principales. Primero, los cromosomas homólogos están alineados. Segundo, se genera una rotura de doble cadena en una molécula de DNA y los extremos son procesados por una exonucleasa que deja una extensión de cadena sencilla con un grupo 3'-hidroxilo libre en el extremo roto (paso ❶). Tercero, los extremos 3' expuestos invaden el dúplex de DNA intacto del homólogo para que acto seguido la migración de la rama o la replicación creen un par de intermedios de Holliday (pasos ❷ a ❹). Cuarto, el corte de los dos entrecruzamientos crea uno u otro de dos tipos de productos recombinantes completos (paso ❺). Obsérvese la similitud de estas etapas con los procesos de reparación bacterianos mostrados en la Figura 25-30.



COPY-STATION

FIGURA 25-35 Recombinación durante la profase I de la meiosis. (a) Modelo de la reparación de roturas de doble cadena para la recombinación genética homologa. Los dos cromosomas homólogos (uno mostrado en rojo y el otro en azul) de esta recombinación tienen secuencias idénticas o casi idénticas. Cada uno de los dos genes mostrados tiene alelos distintos en los dos cromosomas. Las distintas etapas se describen el texto. **(b)** Durante la profase I de la meiosis tiene lugar el entrecruzamiento. Las diferentes etapas de la profase I están alineadas con los procesos de recombinación que tienen lugar en la parte **(a)**. Los cortes de cadena doble se introducen y procesan en el leptoteno. La invasión de la hebra y la finalización del entrecruzamiento suceden más tarde. A medida que se alinean las secuencias homólogas de los dos pares de cromátidas hermanas en la etapa del zigoteno, se forman los complejos sinaptonémicos y se produce la invasión de la hebra. En el paquiteno los cromosomas homólogos están densamente alineados. **(c)** Se muestran los cromosomas homólogos del grillo en sucesivas etapas de la profase meiótica I. Los quiasmas son visibles en la fase del diploteno. [Fuente: **(c)** B. John, Meiosis, Figs 2.1a, 2.2a, 2.2b, 2.3a, Cambridge University Press, 1990. Reproducido con el permiso de Cambridge University Press]

RECUADRO 25-2 MEDICINA Por qué es importante la segregación correcta de los cromosomas

Cuando el alineamiento de los cromosomas y la recombinación no son correctos y completos en la meiosis I, la segregación de los cromosomas puede verse afectada. Una de las consecuencias puede ser la aneuploidía, en la cual una célula no tiene el número correcto de cromosomas. Los productos haploides de la meiosis (gametos o esporas) pueden no tener ninguna copia de un cromosoma o, por el contrario, tener dos. Cuando un gameto con dos copias de un cromosoma se une con un gameto con una copia durante la fertilización, las células en el embrión resultante tienen tres copias de este cromosoma (son trisómicos).

En *S. cerevisiae*, la aneuploidía resultante de errores en la meiosis ocurre a razón de 1 de cada 10.000 procesos mitóticos. En la mosca del vinagre la tasa es de 1 de varios millares. Las tasas de aneuploidía en los mamíferos son considerablemente mayores. En los ratones la tasa es de 1 de cada 100, y es incluso superior en otros mamíferos. La tasa de aneuploidía en los óvulos humanos fecundados es del 10% al 30%; la mayoría de las células aneuploides son monosómicas (una única copia de un cromosoma) o trisómicas. Estos valores son ciertamente estimaciones a la baja. La mayoría de trisomías son letales y muchas resultan en abortos espontáneos mucho antes de que el embarazo sea detectado. La aneuploidía es la causa principal de la pérdida del embarazo. Los pocos fetos trisómicos que sobreviven hasta el nacimiento generalmente tienen tres copias de los comosomas 13, 18 o 21 (la trisomía 21 provoca el síndrome de Down). En las poblaciones humanas también se encuentran dotaciones anormales de los cromosomas sexuales. Casi todas la monosomías son fatales en las primeras etapas del desarrollo fetal. Las consecuencias sociales de la aneuploidía en humanos son considerables. La aneuploidía es la principal causa genética de discapacidades mentales y del desarrollo. En el núcleo de estas elevadas tasas de aneuploidía se encuentra una característica de la meiosis de las hembras de mamífero que posee una especial significación para la especie humana.

En el macho humano las células de la línea germinal empiezan a experimentar meiosis en la pubertad, y cada proceso meiótico requiere un tiempo relativamente corto. En cambio, la meiosis en la línea germinal de las hembras humanas es un proceso extremadamente prolongado. La producción de un óvulo empieza antes del nacimiento, con el inicio de la meiosis en el feto, a las 12 o 13 semanas de gestación. La meiosis empieza en todas las células germinales en desarrollo en un período de unas pocas semanas. Las células completan buena parte de la meiosis I. Los cromosomas se alinean y generan entrecruzamientos, hasta llegar justo después de la fase de paquiteno (véase la Fig. 25-35), y entonces el proceso se detiene. Los cromosomas entran en una fase de latencia denominada dictiado, con los entrecruzamientos en su lugar, en la que permanecen hasta la madurez sexual (normalmente de los 13 a los 50 años). No es hasta la madurez sexual que las células germinales individuales proceden a través de las dos divisiones celulares meióticas para producir los óvulos.

Entre el inicio del dictiado y la finalización de la meiosis, puede suceder algo que altere o dañe los entrecruzamientos que unen los cromosomas homólogos de las células germinales. A medida que una mujer envejece la frecuencia de trisomías en los óvulos aumenta, y de forma espectacular cuando se acerca la menopausia (Fig. 1). Hay muchas hipótesis para explicar por qué ocurre, y diferentes factores pueden jugar un papel. Sin embargo, la mayoría de hipótesis giran en torno de los entrecruzamientos de la recombinación en la meiosis I y en su estabilidad a lo largo del prolongado dictiado.

No está claro qué medidas podrían tomarse para reducir la frecuencia de la aneuploidía en las hembras en edad de procrear. Lo que sí se pone de m. Datos tomados anifiesto es la importancia de la recombinación y los entrecruzamientos en la meiosis humana.

Copy-Station

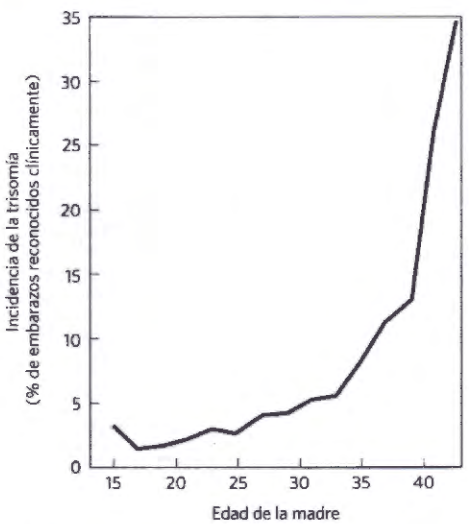


FIGURA 1 Aumento de la incidencia de trisomía humana con la edad de la madre. [Fuente: Información obtenida desde T. Hassold and P. Hunt, Nature REv. Genet. 2:280, 2001, Fig 6]

En este **modelo de reparación por rotura de doble cadena** para la recombinación, se usan los extremos 3' para iniciar el intercambio genético. Una vez apareados con la hebra complementaria en el homólogo intacto, se crea una región de DNA híbrido que contiene hebras complementarias de dos DNA parentales diferentes (el producto del paso ❷ de la Fig. 25-35a). Cada uno de los extremos 3' puede actuar entonces como un cebador para la replicación del DNA. La recombinación meiótica homóloga puede diferir en muchos detalles de

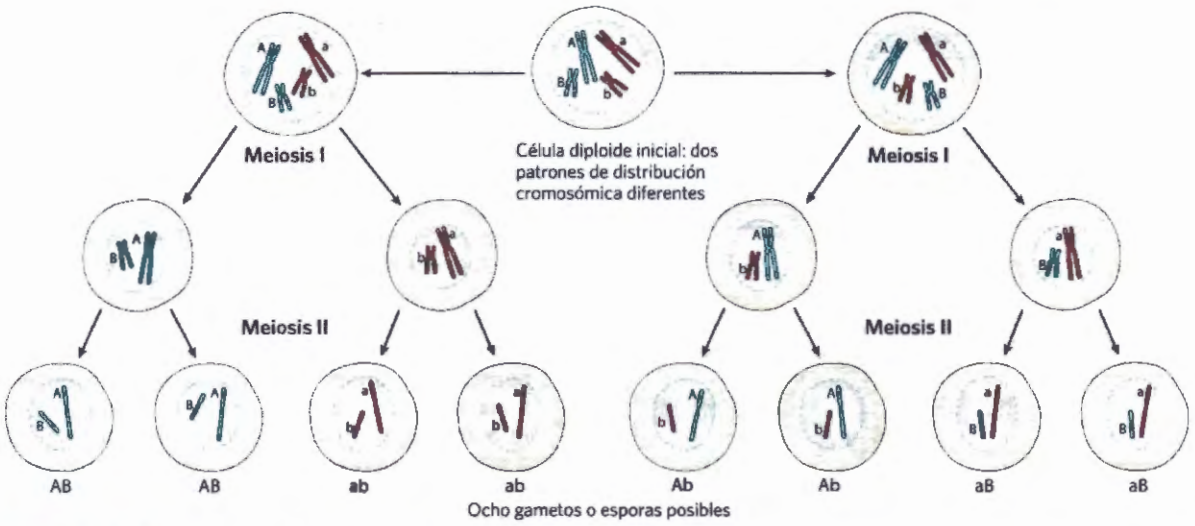


FIGURA 25-36 Contribución de la segregación independiente a la diversidad genética. En este ejemplo, los cromosomas ya se han replicado para formar dos parejas de cromátidas hermanas para dos cromosomas. El azul y el rojo distinguen las cromátidas hermanas de cada par. Se destaca un gen en cada cromosoma con diferentes alelos (A o *a*, B o *b*) en los homólogos. La segregación independiente puede producir gametos con cualquiera de las combinaciones de alelos presente en los dos cromosomas diferentes. El entrecruzamiento (no mostrado aquí; véase la Fig. 25-34) también contribuiría a la diversidad genética en una secuencia meiótica típica.

una especie a otra, pero la mayoría de los pasos arriba indicados están generalmente presentes de una u otra forma. Hay dos maneras para cortar o "resolver" el intermedio de Holliday con una nucleasa del tipo RuvC, de forma que los dos productos tengan sus genes dispuestos en el mismo orden lineal que en los sustratos; es decir, los cromosomas originales no recombinados (paso ❺). Si se corta de una forma, el DNA que limita con la región que contiene el DNA híbrido no se recombina; si se corta de la otra forma, el DNA limitante se recombina. Ambos resultados se observan in vivo.

La recombinación homóloga ilustrada en la Figura 25-35 es un proceso muy elaborado que es esencial para la segregación correcta de los cromosomas. Sus consecuencias moleculares para la generación de diversidad genética se manifiestan de forma sutil. Para entender de qué modo este proceso contribuye a la diversidad, hay que tener presente que los dos cromosomas homólogos que experimentan recombinación no son necesariamente *idénticos*. La secuencia lineal de los genes puede ser la misma, pero las secuencias de bases en algunos genes pueden diferir ligeramente (en alelos diferentes). En un individuo humano, por ejemplo, un cromosoma puede contener el alelo de la hemoglobina A (hemoglobina normal), mientras que el otro contiene el alelo de la hemoglobina S (la mutación falciforme). La diferencia puede ser de sólo un par de bases entre millones. La recombinación homóloga no cambia la secuencia lineal de los genes, pero puede determinar qué alelos quedan ligados en un mismo cromosoma y, por tanto, pasan juntos a la siguiente generación. La segregación independiente de los diferentes cromosomas (Fig. 25-36) determina qué alelos génicos de los diferentes cromosomas se heredan juntos.

Algunas rupturas de la doble hebra de DNA se reparan por la unión de extremos no homólogos (NHEJ)

Las rupturas de doble hebra del DNA ocurren a veces cuando el sistema de reparación por recombinación no es factible, como en las fases de ciclo celular donde el DNA no se está replicando y las cromatidas hermanas no están presentes. En estos momentos, es necesario otro mecanismo para que la célula no muera debido a la rotura del cromosoma. Esta alternativa es proporcionada por el mecanismo de la **unión de extremos no homólogos (NHEJ)**. Los extremos del cromosoma son simplemente procesados y ligados juntos de muevo

La unión de extremos no homólogos (NHEJ) es uno de los sistemas de reparación de la ruptura de la doble cadena de DNA más importante en todos los eucariotas y también ha sido detectado en algunas bacterias. La importancia de NHEJ incrementa con la complejidad genómica, y el proceso ocurre, en mamíferos, para la mayoría de rupturas de la doble cadena del DNA fuera de la meiosis. En levadura la mayoría de rupturas de la doble hebra de DNA es reparada por recombinación, únicamente unas pocas por NHEJ. NHEJ es un proceso mutagénico, y un genoma pequeño, como el de la levadura, tiene relativamente poca tolerancia para la perdida de información. Alteraciones pequeñas en el genoma pueden ser toleradas en las células somáticas de mamíferos, porque hay una compensación de la información mutada con la información intacta del homologo presente en cada célula diploide, y además en estas células no germinales, las mutaciones no se heredan. En vertebrados, la perdida de los genes codificantes para la función NHEJ puede producir predisposición al cáncer.

A diferencia de la reparación por recombinación homóloga, NHEJ no conserva la secuencia de DNA original. En la **figura 25-37** se ilustra este mecanismo en eucariotas. La reacción se inicia en los extremos de una ruptura de la doble hebra de DNA mediante la unión de un heterodímero formado por las proteínas Ku70 y Ku80 (Ku proviene de las iniciales de un individuo con esclerodermia cuyos autoanticuerpos séricos se utilizaron para identificar este complejo proteico, el número se refiere al peso molecular aproximado de las subunidades). Las proteínas Ku son conservadas en casi todos

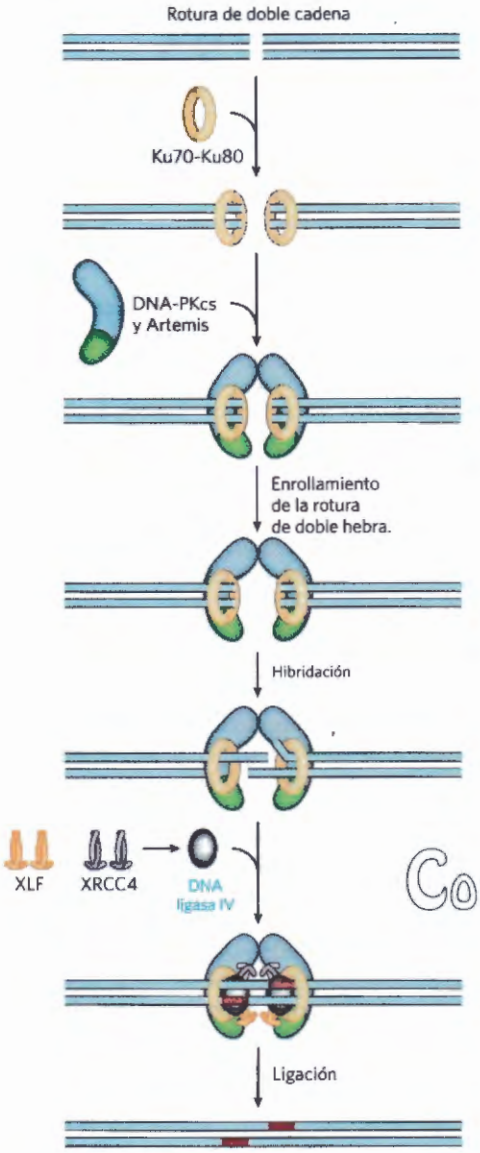


FIGURA 25-37 Unión de extremos no homologos (NHEJ). El complejo Ku70-Ku80 es el primero que se une al extremo del DNA, seguido por el complejo que incluye DNA-PKc y la nucleasa llamada Artemis. Estas proteínas reclutan entonces el complejo constituido por XRCC4, XLF, y la DNA ligasa IV. Posteriormente, cualquiera de las DNA polimerasas, Pol μ o Pol λ (no se muestran), extiende la hebra de DNA hibridado, según sea necesario, antes de la ligación. [Fuente: Información de J.M. Sekiguchi and D.O. Ferguson, *Cell* 124:260, 2006, Fig 1]

los eucariotas y actúan como un tipo de armazón molecular para ensamblar el resto de los componentes proteicos. Ku70-Ku80 interacciona con otro complejo proteico que contiene: la proteínan quinasa, denominada DNA-PKcs, y una nucleasa conocida como Artemis. Una vez el complejo está formado, los dos extremos rotos del DNA son unidos (sinapsis). DNA-PKcs se autofosforilan en diversos sitios y también fosforilan a Artemis. Cuando Artemis esta fosforilada adquiere la función endonucleasa, qué elimina las extensiones 5' y 3' en forma de monohebras o las horquillas de DNA que pueden estar presentes en los extremos rotos. Los extremos del DNA se separan luego con la ayuda de una helicasa y las hebras de cada uno de los dos extremos híbridan por la presencia de cortas regiones de complementariedad. Artemis corta los segmentos de DNA no apareados que se han formado por la hibridación parcial de los extremos. Estos pequeños huecos son rellenados por la DNA polimerasa, Pol μ o la Pol λ. Finalmente, las mellas son selladas por un complejo proteico formado por: XRCC4 (grupo de complementación cruzada de rayos x), XLF (factor parecido a XRCC4), y la DNA ligasa IV.

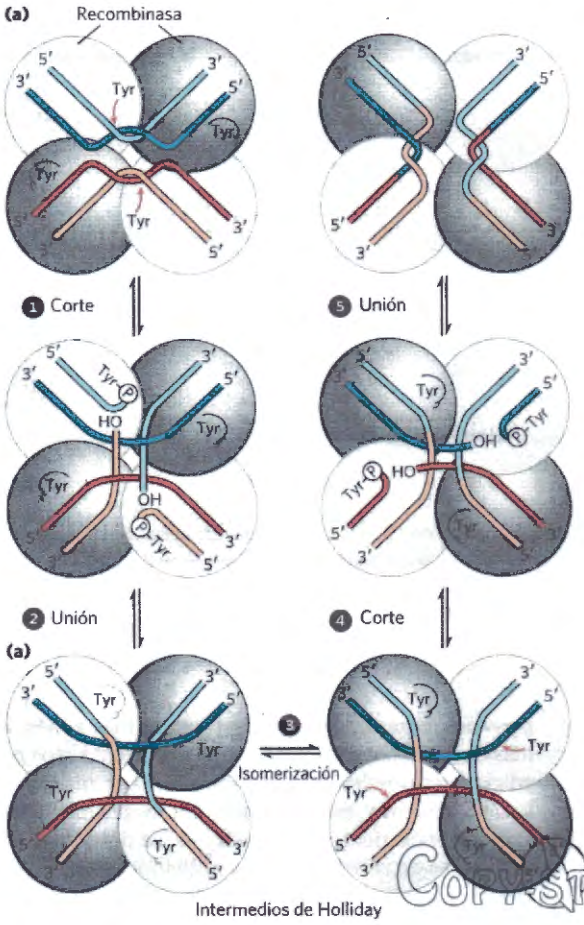
Los extremos de DNA no son unidos al azar por NHEJ. De hecho, cuando ocurre una ruptura de doble hebra de DNA, los extremos son generalmente limitados por la estructura de la cromatina y por lo tanto permanecen juntos. Rara vez se unen extremos con secuencias que se encuentran normalmente alejadas en el cromosoma, o que son de cromosomas diferentes. Estas uniones poco frecuentes pueden ser responsables de reordenamientos genómicos ocasionales dramáticos y usualmente deletéreos.

La recombinación específica de sitio produce reordenamientos precisos del DNA

En la recombinación genética homóloga pueden intervenir dos secuencias homólogas cualesquiera. El segundo tipo general de recombinación, la recombinación específica de sitio, es un proceso muy diferente, pues está limitado a secuencias específicas. Las reacciones de recombinación de este tipo tienen lugar en prácticamente todas las células, con funciones especializadas que varían en gran medida de una especie a otra. Entre estas funciones se encuentran la regulación de la expresión de ciertos genes, la promoción de reordenamientos programados del DNA durante el desarrollo embrionario o en los ciclos de replicación de algunos DNA de virus y plásmidos. Todos los sistemas de recombinación específica de sitio requieren un enzima denominado recombinasa y una secuencia única de DNA corta (20 a 200 pb) sobre la que actúa la recombinasa (el sitio de recombinación). Una o más proteínas auxiliares pueden regular el momento o los efectos de la reacción.

COPY-STATION

Hay dos clases generales de sistemas de recombinación específicos de sitio, según utilicen residuos de Tyr o Ser en el sitio activo. Estudios in vitro de numerosos sistemas de recombinación específica de sitio de la clase de la tirosina han permitido conocer algunos principios generales, incluida la ruta fundamental de la reacción **(Fig. 25-38a)**. Gracias a que estos enzimas se han cristalizado, se han conocido detalles estructurales de la reacción. Una recombinasa distinta reconoce y se une a cada uno de los dos sitios de recombinación en dos moléculas de DNA diferentes o en la misma molécula de DNA. En cada sitio se corta una cadena de DNA en un punto específico dentro del sitio y la recombinasa se une covalentemente al DNA en el punto de corte mediante un enlace de fosfotirosina (paso ❶). El enlace transitorio proteína-DNA conserva el enlace fosfodiéster que se pierde al cortar el DNA, de forma que los cofactores de alta energía como el ATP resultan innecesarios en los pasos siguientes. Las hebras de DNA cortadas se unen de nuevo a nuevas parejas para formar un intermedio de Holliday, con nuevos enlaces fosfodiéster creados a expensas del enlace proteína-DNA (paso ❷). A continuación se produce un paso



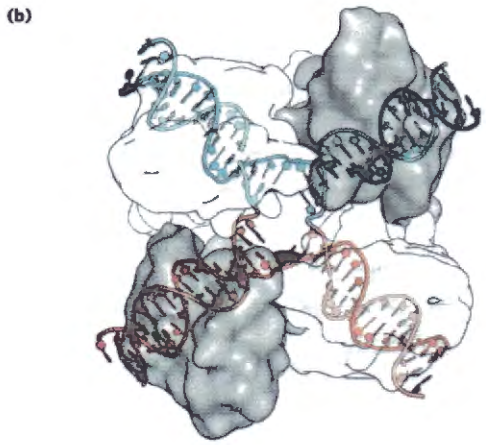


FIGURA 25-38 Una reacción de recombinación específica de sitio. **(a)** La reacción mostrada es para una clase común de recombinasas con especificidad de sitio denominadas recombinasas de la clase integrasa (llamadas así por la integrasa del bacteriófago λ, la primera en ser caracterizada). Estos enzimas utilizan residuos de Tyr del sitio activo como nucleófilos. La reacción se lleva a cabo en un tetrámero de subunidades idénticas. Las subunidades de la recombinasa se unen a una secuencia específica, que constituye el sitio de recombinación. ❶ Una cadena de cada uno de los DNA es cortada en puntos específicos de la secuencia. El nucleófilo es el grupo -OH de un residuo Tyr del sitio activo y el producto es un ❷ enlace covalente fosfotirosina entre la proteína y el DNA. Después de una isomerización ❸ las hebras cortadas se unen a otras hebras, formando un intermedio de Holliday. Los pasos ❹ y ❺ completan la reacción en un proceso similar al de los dos primeros pasos. La secuencia original del sitio de recombinación se regenera después de recombinar el DNA que flanquea el sitio. Las reacciones tienen lugar en un complejo de múltiples subunidades de recombinasa, que a veces incluye otras proteínas que no se muestran aquí. **(b)** Modelo de contorno de la superficie de una recombinasa de cuatro subunidades de la clase integrasa, denominada recombinasa FLP, unida a un intermedio de Holliday (las hebras se muestran en azul claro y en azul oscuro). La proteína se representa en transparencia para que el DNA sea visible Otro grupo de recombinasas, denominadas familia resolvasa/invertasa utilizan un residuo de Ser del sitio activo como nucleófilo. [Fuente: **(b)** de PDB ID 1P4E, P. Rice and Y. Chen, *J. Biol. Chem.* 278).

de isomerización (paso ❸), y el proceso se repite en un segundo punto dentro de cada uno de los dos sitios de recombinación (pasos ❹ y ❺). En los sistemas que usan un residuo de Ser en el sitio activo, ambas hebras de cada sitio de recombinación se cortan a la vez y son unidas a las nuevas parejas sin la formación de un intermedio de Hollyday. En ambos sistemas el intercambio es siempre recíproco y preciso y los sitios de recombinación se regeneran cuando se ha completado la reacción. Se puede concebir una recombinasa como una endonucleasa específica de sitio y una ligasa en un solo enzima.

Las secuencias de los sitios de recombinación reconocidas por las recombinasas específicas de sitio son parcialmente asimétricas (no palindrómicas) y los dos sitios de recombinación se alinean con la misma orientación durante la reacción de la recombinasa. El resultado depende de la localización y la orientación de los sitios de recombinación **(Fig. 25-39)**. Si los dos sitios están en la misma molécula de DNA, la reacción da lugar a la deleción o a la inversión del DNA limitado por ellos, según que los sitios tengan la misma orientación o la contraria, respectivamente. Si los sitios están en moléculas de DNA diferentes, la recombinación es intermolecular; si uno de los DNA, o los dos, son circulares se produce una inserción. Algunos sistemas de la recombinasa son muy específicos para una de estas reacciones y actúan solamente sobre sitios con una orientación determinada.

La recombinación específica de sitio puede ser necesaria para completar la replicación del cromosoma. La reparación del DNA por recombinación del cromosoma circular bacteriano, aunque indispensable, a veces genera productos secundarios dañinos. La eliminación de un intermedio de Holliday en una horquilla de replicación por una nucleasa tal como RuvC, seguida por la finalización de la replicación, puede dar lugar a uno de dos productos: los dos cromosomas monoméricos normales o bien un cromosoma dimérico contiguo **(Fig. 25-40)**. En este último caso, los cromosomas unidos covalentemente no pueden segregarse en las células hijas durante la división celular, y las células hijas quedan "pegadas". Un sistema especializado de recombinación específica de sitio de *E. coli*, denominado sistema XerCD, convierte los cromosomas diméricos en cromosomas monoméricos, para que la división celular pueda continuar. La reacción consiste en una deleción específica de sitio (Fig. 25-39b). Este es otro ejemplo de la

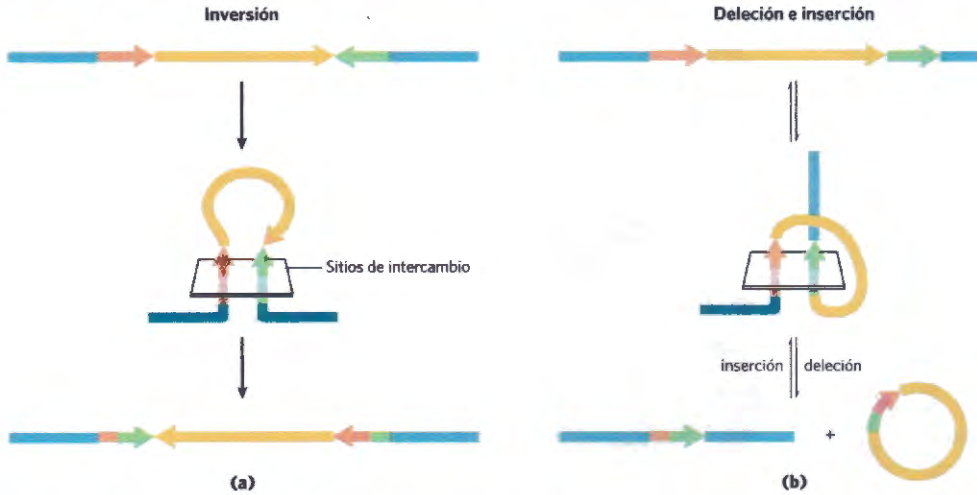


FIGURA 25-39 Resultado de la recombinación específica de sitio. El resultado de la recombinación específica de sitio depende de la localización y de la orientación de los sitios de recombinación (rojo y verde) en una molécula de DNA de doble cadena. La orientación (indicada por flechas) se refiere al orden de los nucleótidos en el sito de recombinación, no a la dirección 5'→3'. **(a)** Sitios de recombinación con orientaciones opuestas en la misma molécula de DNA. El resultado es una inversión. **(b)** Sitios de recombinación con la misma orientación, sea en una molécula de DNA, que da lugar a una deleción, sea en dos moléculas de DNA, que resulta en una inserción.

estrecha coordinación entre los procesos de recombinación del DNA y otros aspectos del metabolismo del DNA.

Los elementos genéticos transponibles se mueven de un lugar a otro

Ahora examinaremos el tercer sistema general de recombinación, la que permite el movimiento de los elementos transponibles, o **transposones**. Se trata de segmentos de DNA, presentes en prácticamente todas las células, que se mueven o "saltan" de un lugar del cromosoma (el sitio dador) a otro en el mismo o diferente cromosoma (el sitio receptor). La homología de las secuencias de DNA normalmente no es necesaria para este movimiento, denominado **transposición;** la nueva localización es elegida más o menos al azar. La inserción de un transposón en un gen esencial podría matar la célula, por lo que la transposición está fuertemente regulada y normalmente es muy poco frecuente. Los transposones son tal vez los parásitos moleculares más simples que han logrado replicarse pasivamente dentro del cromosoma de las células huésped. En algunos casos transportan genes que son útiles para la célula huésped, con la que mantienen una especie de simbiosis.

Las bacterias tienen dos tipos de transposones. Las **secuencias de inserción** (transposones simples) contienen solamente las secuencias requeridas para la transposición y los genes para las proteínas (transposasas) que promueven el proceso. Los **transposones complejos** contienen uno o más genes, además de los necesarios para la transposición. Estos genes adicionales pueden, por ejemplo, conferir resistencia a los antibióticos y, por tanto, mejorar las posibilidades de supervivencia de la célula huésped. La diseminación de elementos de resistencia a los antibióticos en las poblaciones bacterianas causantes de enfermedades, que hacen perder eficacia a algunos antibióticos se debe en parte a la transposición. ■

Copy-Station

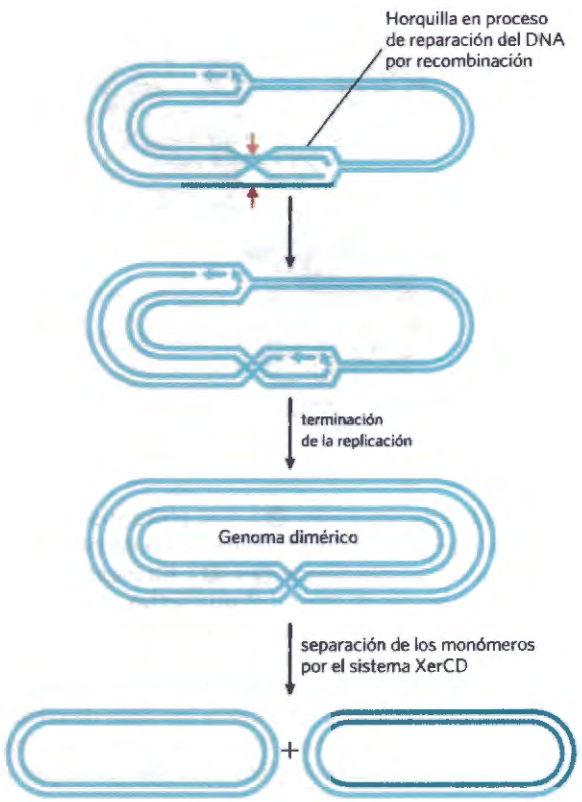


FIGURA 25-40 Deleción de DNA para neutralizar los efectos deletéreos de la reparación del DNA por recombinación. La resolución de un intermedio de Holliday durante la reparación del DNA por recombinación puede (si se corta en los puntos indicados por las flechas negras) generar un cromosoma dimérico continuo. Una recombinasa especializada específica de sitio de *E. coli*, denominada XerCD, convierte el dímero en monómeros, permitiendo así la segregación de los cromosomas y la reanudación de la división celular.

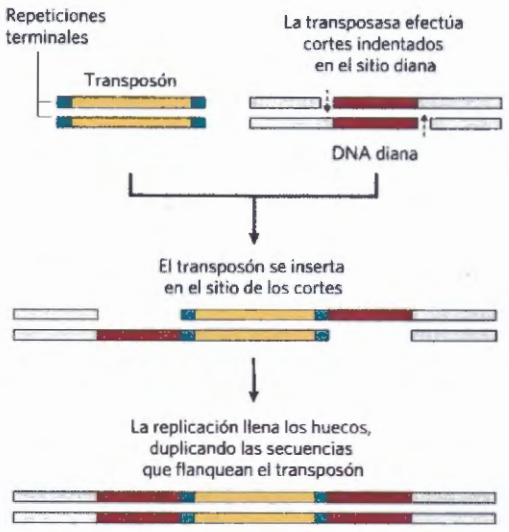


FIGURA 25-41 Duplicación de la secuencia de DNA en un sitio diana cuando se inserta un transposón. Las secuencias duplicadas durante la inserción de un transposón se muestran en rojo. Estas secuencias tienen generalmente sólo unos pocos pares de bases y su tamaño, comparado con el de un transposón típico, está muy exagerado en este dibujo.

Los transposones bacterianos varían en estructura, pero la mayoría tienen cortas secuencias repetitivas en cada extremo, que sirven de sitios de unión de la transposasa. Cuando ocurre la transposición, una corta secuencia del sitio de inserción (de 5 a 10 pb) se duplica para formar una corta secuencia repetida adicional que flanquea cada extremo del transposón insertado (**Fig. 25-41**). Estos segmentos duplicados son producidos por el mecanismo de corte responsable de insertar el transposón en una nueva localización del DNA.

En las bacterias hay dos rutas generales para la transposición. En la transposición simple o directa (**Fig. 25-42**, izquierda), el transposón es escindido por cortes a ambos lados y el transposón se desplaza hasta una nueva localización. Este proceso deja una rotura de cadena doble en el DNA dador que debe ser reparada. En el lugar de inserción se produce un corte indentado (tal como se ve en la Fig. 25-41), el transposón se inserta en la rotura y la replicación del DNA llena el hueco para duplicar la secuencia de la diana. En la transposición replicativa (Fig. 25-42, derecha), se replica el transposón completo, dejando atrás una copia en el sitio que hace de dador. El **cointegrado** es un intermedio de este proceso, consistente en la región dadora unida covalentemente al DNA del sitio receptor. En el cointegrado hay dos copias completas del transposón, ambas con la misma orientación relativa en el DNA. En algunos transposones bien caracterizados, el cointegrado intermedio se transforma por recombinación específica de sitio, en la que recombinasas especializadas promueven la necesaria reacción de deleción.

Los eucariotas también tienen transposones estructuralmente similares a los transposones bacterianos y, a veces, con mecanismos de transposición similares. En otros casos, sin embargo, parece ser que el mecanismo de trasposición utiliza un intermedio de RNA. Estos transposones han coevolucionado con ciertas clases de virus de RNA. Ambos se describirán en el capítulo siguiente. Como se ilustra en la Figura 9-27, cerca de la

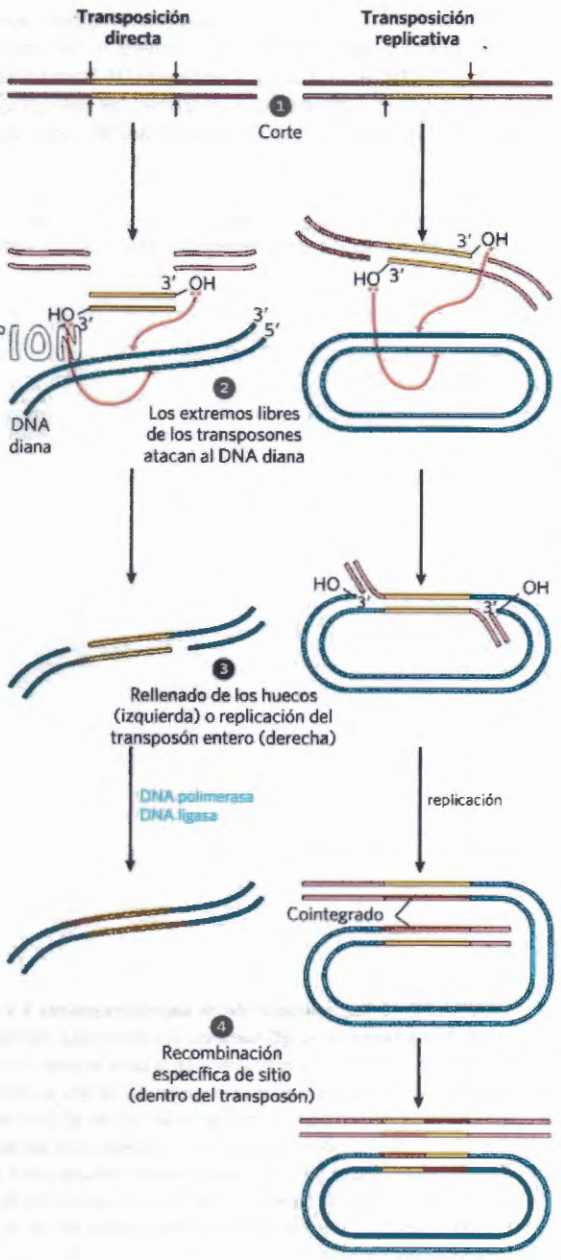


FIGURA 25-42 Dos rutas generales para la transposición: directa (simple) y replicativa. ❶ El DNA primero se corta a cada lado del transposón en los lugares indicados por las flechas. ❷ Los grupos 3′-hidroxilo liberados en los extremos del transposón actúan de nucleófilos en un ataque directo sobre los enlaces fosfodiéster del DNA diana. Los enlaces fosfodiéster diana están desplazados (no se encuentran uno enfrente del otro) en las dos cadenas del DNA. ❸ El transposón se encuentra ahora unido al DNA diana. En la transposición directa (izquierda), la replicación llena los huecos en cada extremo para completar el proceso. En la transposición replicativa (derecha) se replica el transposón entero formándose un intermedio cointegrado. ❹ El cointegrado es a menudo escindido más tarde con ayuda de otro sistema de recombinación específico de sitio. El DNA huésped cortado dejado atrás por la transposición directa se repara por unión de los extremos o bien se degrada (no mostrado). Esta última posibilidad puede ser letal para el organismo.

mitad del genoma humano está formado por varios tipos de elementos de transposición.

Los genes de las inmunoglobulinas se forman por recombinación

Algunos reordenamientos del DNA forman parte del programa de desarrollo de los organismos eucaróticos. Un ejemplo importante es la producción de genes completos de inmunoglobulinas a partir de segmentos de genes que se hallan separados en el genoma de los vertebrados. Los humanos (como otros mamíferos) son capaces de producir *millones* de inmunoglobulinas (anticuerpos) diferentes con especificidades de unión diferentes, a pesar de que el genoma humano sólo contiene unos 20.000 genes. La recombinación permite a un organismo producir una variedad extraordinaria de anticuerpos a partir de una capacidad de codificación de DNA limitada. El estudio del mecanismo de recombinación ha mostrado una estrecha relación con la transposición del DNA, y sugiere que el sistema para generar la diversidad de los anticuerpos puede haber evolucionado a partir de una antigua invasión de transposones.

Los genes humanos que codifican las inmunoglobulinas de la clase G (IgG) pueden servir para ilustrar como se genera la diversidad de los anticuerpos. Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos ligeras (véase la Fig. 5-21). Cada cadena tiene dos regiones, una región variable, con una secuencia que difiere mucho de una inmunoglobulina a otra y otra región que es prácticamente constante dentro de cada clase de inmunoglobulinas. Existen también dos familias distintas de cadenas ligeras, denominadas kappa y lambda, que difieren algo en la secuencia de sus regiones constantes. Para cada uno de los tres tipos de cadena polipeptídica (cadena pesada y cadenas ligeras kappa y lambda), la diversidad en las regiones variables se genera mediante un mecanismo similar. Los genes de estos polipéptidos están divididos en segmentos y el genoma contiene agrupamientos con múltiples versiones de cada segmento. La unión de una versión de cada segmento crea un gen completo.

La **Figura 25-43** la organización del DNA que codifica las cadenas ligeras kappa de las IgG humanas, y muestra cómo se genera una cadena ligera kappa madura. En células sin diferenciar, la información que codifica esta cadena polipeptídica está distribuida en tres segmentos. El segmento V (variable) codifica los 95 primeros residuos aminoácidos de la región variable, el segmento J (de unión) codifica los 12 residuos restantes de la región variable y el segmento C codifica la región constante. El genoma contiene unos 300 segmentos V diferentes, 4 segmentos J diferentes y un segmento C.

Cuando una célula madre de la médula ósea se diferencia para formar un linfocito B maduro, se yuxtaponen un segmento V y un segmento J por un mecanismo de recombinación especializado (Fig. 25-43). Durante

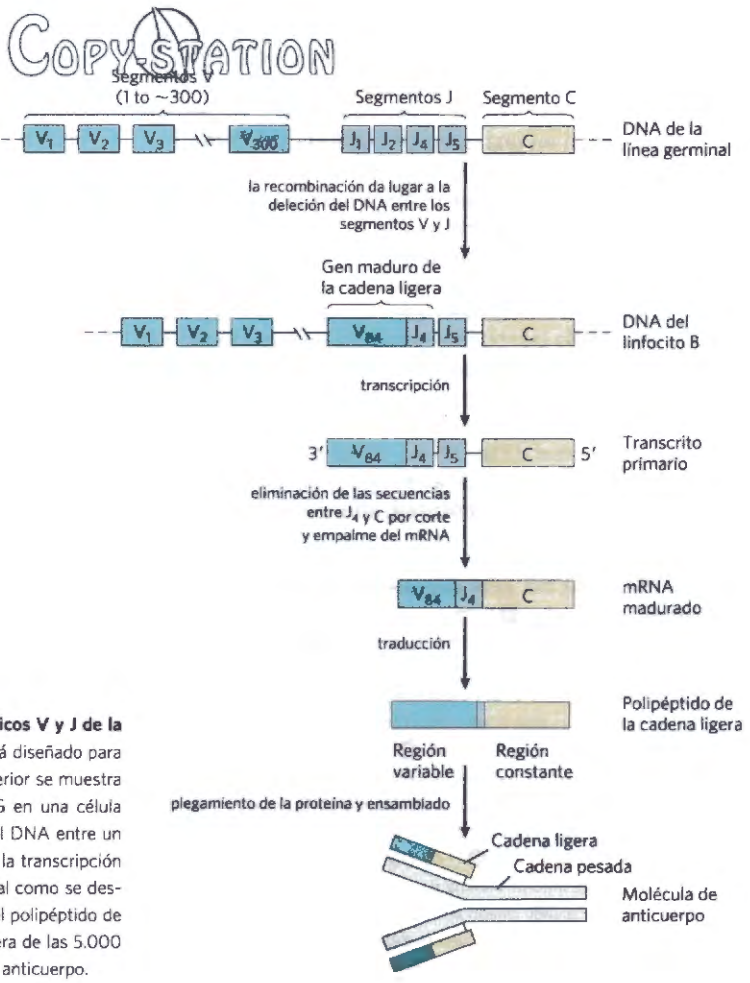


FIGURA 25-43 Recombinación de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera kappa de las IgG humanas. El proceso está diseñado para generar la diversidad de los anticuerpos. En la parte superior se muestra la disposición de las secuencias codificantes de las IgG en una célula germinal de la médula ósea. La recombinación elimina el DNA entre un segmento V determinado y un segmento J. Después de la transcripción el transcrito se procesa por corte y empalme del RNA, tal como se describe en el Capítulo 26, y luego traducido para producir el polipéptido de la cadena ligera. La cadena ligera puede unirse a cualquiera de las 5.000 posibles cadenas pesadas para producir una molécula de anticuerpo.

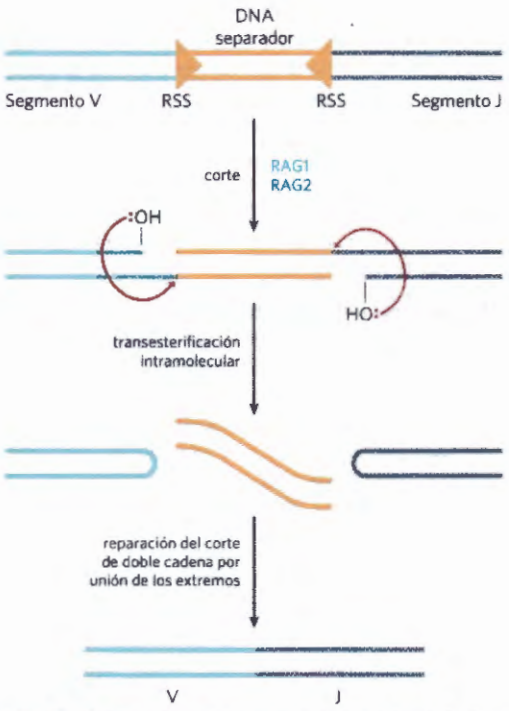


FIGURA 25-44 Mecanismo del reordenamiento génico de las inmunoglobulinas. Las proteínas RAG1 y RAG2 se unen a las secuencias señal de recombinación (RSS) y cortan una cadena del DNA entre la RSS y los segmentos V (o J) que deben unirse. El extremo 3' hidroxilo liberado actúa entonces de nucleófilo, atacando un enlace fosfodiéster en la otra cadena para crear un corte de doble cadena. Las horquillas resultantes en los segmentos V y J son cortadas y los extremos se unen covalentemente por un complejo proteico especializado en la reparación y en la unión de extremos en cortes de doble cadena. Las etapas implicadas en el corte de cadena doble catalizado por RAG1 y RAG2 están relacionadas químicamente con las etapas descritas en las reacciones de transposición.

esta deleción programada se elimina el DNA intercalado. Hay unas 300 x 4 = 1.200 combinaciones V-J posibles. Este proceso de recombinación no es tan preciso como la recombinación específica de sitio descrita anteriormente por lo que se producen cambios adicionales de la secuencia en la unión V-J que aumentan la variación global en un factor de al menos 2,5; por tanto, las células pueden generar unas 2,5 x 1.200 = 3.000 combinaciones V-J diferentes. La unión final de la combinación V-J a la región C se obtiene por una reacción de corte y empalme de RNA después de la transcripción, proceso descrito en el Capítulo 26.

En la **Figura 25-44** se ilustra el mecanismo de recombinación para unir los segmentos V y J. Inmediatamente después de cada segmento V y justo antes de cada segmento J se encuentran secuencias señal de recombinación (RSS), a las que se unen unas proteínas denominadas RAG1 y RAG2 (productos del *g*en *a*ctivador de la *r*ecombinación). Las proteínas RAG catalizan la formación de una rotura de doble cadena entre las secuencias señal y los segmentos V (o J) que se han de unir. Los segmentos V y J se unen seguidamente con la ayuda de un segundo complejo de proteínas.

Los genes de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras lambda se forman de modo similar. Para las cadenas pesadas existen más segmentos génicos que para las ligeras por lo que son posibles más de 5.000 combinaciones. Debido a que cada cadena pesada se puede combinar con cualquier cadena ligera para generar una inmunoglobulina, cada individuo tiene al menos 3.000 x 5.000, es decir 1,5 x 10^7 IgG posibles. Se genera aún más diversidad debido a que las secuencias V están sujetas a elevadas tasas de mutación (cuyo mecanismo es desconocido) durante la diferenciación de los linfocitos B. Cada linfocito B maduro produce un solo tipo de anticuerpo, pero la gama de anticuerpos producida por los linfocitos B de organismo es enorme.

¿Evolucionó el sistema inmunitario en parte a partir de antiguos transposones? El mecanismo para la producción de cortes de doble cadena por RAG1 y RAG2 es paralelo a varios pasos de la transposición (Fig. 25-44). Además, el DNA eliminado, con sus secuencias terminales RSS, tiene una estructura secuencial que se encuentra en la mayoría de transposones. En el tubo de ensayo, RAG1 y RAG2 pueden asociarse con este DNA delecionado e insertarlo, como si fuese un transposón, en otras moléculas de DNA (una reacción que probablemente ocurre sólo muy raramente en los linfocitos B). Aunque no podemos estar seguros, las propiedades del sistema de reordenamiento genético de las inmunoglobulinas sugieren un origen en el cual la distinción entre huésped y parásito ha ido desvaneciéndose a lo largo de la evolución.

RESUMEN 25.3 Recombinación del DNA

- Las secuencias de DNA se reorganizan en las reacciones de recombinación en procesos que, en general, están estrechamente coordinados con la replicación o la reparación del DNA.
- La recombinación genética homóloga puede producirse entre dos moléculas de DNA cualesquiera que compartan homología de secuencia. En las bacterias, la recombinación actúa principalmente como un proceso de reparación del DNA, centrado en reactivar horquillas de replicación detenidas o colapsadas o en la reparación general de lesiones de doble cadena. En los eucariotas, la recombinación es esencial para asegurar la correcta segregación de los cromosomas en la primera división meiótica. También contribuye a crear diversidad genética en los gametos resultantes.
- La unión de extremos no homólogos (NHEJ) proporciona un mecanismo alternativo para reparar la ruptura de la doble hebra, especialmente en células eucariotas.
- La recombinación específica de sitio se produce solamente en secuencias diana específicas y este proceso también puede involucrar un intermedio de Holliday. Las recombinasas cortan el DNA en sitios específicos y ligan las hebras con nuevas secuencias. Este tipo de recombinación se encuentra prácticamente en todas las células y entre sus muchas funciones se encuentran la integración del DNA y la regulación de la expresión génica.
- Prácticamente en todas las células, los transposones usan la recombinación para desplazarse dentro o entre cromosomas. En los vertebrados, una reacción programada de recombinación relacionada con la transposición une segmentos de inmunoglobulinas para formar los genes de las inmunoglobulinas durante la diferenciación de los linfocitos B.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

molde 981
replicación semiconservadora 981
horquilla de replicación 982
origen 982
fragmento de Okazaki 982
hebra conductora 983
hebra rezagada 983
nucleasas 983
exonucleasas 983
endonucleasas 983
DNA polimerasas 983
DNA polimerasas I 983
cebador 984
extremo del cebador 984
procesividad 984
corrección de pruebas 985
DNA polimerasa III 986
replisoma 987
helicasas 987
topoisomerasas 987
primasas 987
DNA ligasas 987
Elemento de desenrollamiento del DNA (DUE) 989
AAA + ATPasas 989
primosoma 991
catenanos 994
complejo prerreplicativo (pre-RC) 994
autorización 995
proteína de mantenimiento del minicromosoma (MCM) 995
ORC (complejo de reconocimiento del origen) 995
DNA polimerasa ε 996
DNA polimerasa δ 996
DNA polimerasa α 996
reparación por escisión de base 1000
DNA glucosilasas 1000
sitio AP 1000
AP endonucleasas 1001
DNA fotoliasas 1002
síntesis de DNA propensa al error a través de la lesión 1004
respuesta SOS 1004
recombinación genética homóloga 1005
recombinación específica de sitio 1005
transposición del DNA 1005
reparación del DNA por recombinación 1008
migración de la ramificación 1009
intermedio de Holliday 1009
meiosis 1011
modelo de reparación de roturas de doble cadena 1014
unión de extremos no homólogos (NHEJ) 1015
transposón 1018
transposición 1018
secuencia de inserción 1018
cointegrado 1019

Problemas

1. Conclusiones del experimento de Meselson-Stahl El experimento de Meselson-Stahl (véase la Fig. 25-2) demostró que la replicación del DNA es semiconservadora en *E. coli*. En el modelo "dispersivo" de la replicación del DNA, las hebras parentales de DNA se cortan a trozos de tamaño aleatorio, uniéndose seguidamente con piezas del DNA recién replicado para dar nuevos dúplex hijos. Explique por qué los resultados del experimento de Meselson-Stahl descartaron este modelo.

2. Análisis de la replicación del DNA con isótopos pesados Un cultivo de *E. coli* que crece en un medio con $^{15}NH_4Cl$ es transferido a un medio que contiene $^{14}NH_4Cl$ durante tres generaciones (un aumento de ocho veces en la población). ¿Cuál es la relación molar entre el DNA híbrido (^{15}N-^{14}N) y el DNA ligero (^{14}N-^{14}N) en este momento?

3. Replicación del cromosoma de *E. coli* El cromosoma de *E. coli* contiene 4.639.221 pb.

(a) ¿Cuántas vueltas de la doble hélice han de desenrollarse durante la replicación del cromosoma de *E. coli*?

(b) A partir de los datos contenidos en este capítulo, ¿cuánto tiempo tardaría en replicarse el cromosoma de *E. coli* a 37 °C si las dos horquillas de replicación avanzasen desde el origen? Suponga que la replicación avanza a una velocidad de 1000 pb/s. En ciertas condiciones, las células de *E. coli* pueden dividirse cada 20 min ¿Cómo es posible?

(c) En la replicación del cromosoma de *E. coli* ¿cuántos fragmentos de Okazaki podrían formarse? ¿Qué factores garantizan que los numerosos fragmentos de Okazaki se unan en el orden correcto en el nuevo DNA?

4. Composición de bases de los DNA obtenidos a partir de moldes de cadena sencilla Prediga la composición de bases de la totalidad del DNA sintetizado por la DNA polimerasa a partir de un molde consistente en una mezcla equimolecular de las dos cadenas complementarias del DNA circular del bacteriófago ϕX174 (una molécula de DNA circular). La composición de bases de una de las cadenas es A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5% y T, 32,7%. ¿Qué suposición es necesaria para resolver este problema?

5. Replicación del DNA Kornberg y colaboradores incubaron extractos solubles de *E. coli* con una mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, todos marcados con ^{32}P en el grupo α-fosfato. Al cabo de algún tiempo, la mezcla de incubación fue tratada con ácido tricloroacético, que precipita el DNA, pero no los precursores nucleotídicos. El precipitado fue recogido, y la cantidad de precursor incorporado en el DNA fue determinada a partir de la cantidad de radiactividad presente en el precipitado.

¿Si cualquiera de los precursores nucleotídicos fuese omitido de la mezcla de incubación, se encontraría radiactividad en el precipitado? Justificar la respuesta.

¿Se incorporaría ^{32}P en el DNA si solamente estuviese marcado el dTTP? Justificar la respuesta.

¿Se encontraría radiactividad en el precipitado si se marcara con ^{32}P el fosfato β o γ en lugar del α de los desoxirribonucleótidos? Explíquelo.

6. Química de la replicación del DNA Todas las DNA polimerasas sintetizan las hebras nuevas del DNA en la dirección 5'→ 3'. En cierto modo, la replicación de las hebras antiparalelas del DNA sería más sencilla si hubiese un segundo tipo de polimerasa que sintetizase DNA en la dirección 3'→ 5'. Las dos tipos de polimerasa podrían, en principio, coordinar la síntesis de DNA sin necesidad de los complicados mecanismos requeridos para la síntesis de la hebra rezagada. Sin embargo, no se ha encontrado ningún enzima que sintetice en la dirección 3'→ 5'. Sugiera dos posibles mecanismos para la síntesis en dirección 3'→ 5'. El pirofosfato debería ser un producto de ambas reacciones. ¿Podrían uno o ambos mecanismos tener lugar en la célula? ¿Por qué o por qué no? (Sugerencia: podría suponer el uso de precursores inexistentes en las células).

7. Actividades de las DNA polimerasas Se está caracterizando una nueva DNA polimerasa. Cuando se incuba el enzima con DNA marcado con [^{32}P] y sin dNTP se observa la liberación de [^{32}P]dNMP. Esta liberación se evita añadiendo dNTP no marcados. Explique qué reacciones probables soportan estas observaciones. ¿Qué esperaría observar si añadiera fosfato en lugar de dNTP?.

8. Hebras conductora y rezagada Confeccione una tabla que incluya los nombres y compare las funciones de los precursores, los enzimas y otras proteínas necesarios para sintetí-

COPY-STATION

zar la hebra conductora en comparación con la hebra rezagada durante la replicación del DNA en *E. coli*.

9. Función de la DNA ligasa Algunos mutantes de *E. coli* contienen una DNA ligasa defectuosa. Cuando se suministra timina marcada con ^3H a estos mutantes y se sedimenta el DNA sintetizado en gradientes de sacarosa alcalinos se obtienen dos bandas de DNA radiactivo. Una banda es de alta masa molecular, mientras que la otra es de baja masa molecular. Explique este resultado.

10. Fidelidad de la replicación del DNA ¿Qué factores garantizan la fidelidad de la replicación durante la síntesis de la hebra conductora del DNA? ¿Esperaría que la hebra rezagada fuese sintetizada con la misma fidelidad que la hebra conductora? Justifique sus respuestas.

11. Importancia de las DNA topoisomerasas en la replicación del DNA El desenrollamiento del DNA, tal como el que ocurre dnrante la replicación, afecta la densidad superhelicoidal del DNA. En ausencia de topoisomerasas, el DNA sería sobrenrollado por delante de la horquilla de replicación, a medida que el DNA se fuese desenrollando por detrás. Una horquilla de replicación bacteriana se detiene cuando la densidad superhelicoidal (σ) del DNA por delante de la horquilla de replicación alcanza +0,14, (véase el Capítulo 24).

La replicación bidireccional de un plásmido de 6000 pares de bases se inicia en el origen en ausencia de topoisomerasas. El plásmido inicialmente tiene una σ de –0,06. ¿Cuántos pares de bases se desenrollarán y replicarán antes de que las horquillas de replicación se detengan? Suponga que cada horquilla de replicación viaja a la misma velocidad y que todos los componentes necesarios para la elongación están presentes excepto la topoisomerasa.

COPY-STATION

12. Ensayo de Ames En un medio de cultivo carente de histidina, una fina capa de agar que contiene unas 10^9 células de *Salmonella typhimurium*, auxotrofa para la histidina (células mutantes que requieren histidina para sobrevivir), produce unas 13 colonias durante un período de incubación de 2 días a 37 °C (véase la Fig. 25-20). ¿Cómo pueden aparecer estas colonias en ausencia de histidina? El experimento se repite en presencia de 0.4 µg de 2-aminoantraceno. El número de colonias producido en 2 días excede las 10.000. ¿Qué indica este resultado acerca del 2-aminoantraceno? ¿Qué puede deducir acerca de su carcinogenicidad?

13. Mecanismos de reparación del DNA Las células de plantas y vertebrados metilan frecuentemente la citosina del DNA para formar 5-metilcitosina (véase la Fig. 8-5a). En estas mismas células hay un sistema de reparación especializado que reconoce los apareamientos incorrectos G-T y los repara dando pares de bases G≡C. ¿De qué modo este sistema puede ser ventajoso para la célula? (Explíquelo en relación con la presencia de 5-metilcitosina en el DNA.)

14. Coste Energético de la Reparación de Apareamientos Incorrectos. En las células de *E coli*, la DNA polimerasa III comete un error de manera excepcional, inserta una G en oposición a un residuo A, en la posición correspondiente a 650 pb desde la secuencia GATC más cercana. El apareamiento incorrecto es corregido con precisión por el sistema de reparación de apareamientos incorrectos. ¿Cuántos enlaces fosfodiester procedentes de deoxinucleótidos (dNTPs) son consumidos durante la reparación? En este proceso también se utilizan moléculas de ATP, ¿Qué enzima(s) consumen este ATP?

15. Reparación del DNA en pacientes de xeroderma pigmentosum La dolencia conocida como xeroderma pigmentosum (XP) está causada por mutaciones en al menos siete genes humanos diferentes (véase el Recuadro 25-1). Las deficiencias se encuentran en su mayoría en genes que codifican enzimas implicados en la ruta de reparación por escisión de nucleótido. Los diferentes tipos de XP se designan A a G (XPA, XPB, etc.), con unas pocas variantes adicionales agrupadas como XP-V.

Cultivos de fibroblastos procedentes de individuos normales y de pacientes con XPG se irradian con luz ultravioleta, el DNA es aislado y desnaturalizado y el DNA de cadena sencilla resultante caracterizado por ultracentrifugación analítica.

(a) Las muestras procedentes de fibroblastos normales muestran una reducción significativa de la masa molecular media del DNA de cadena sencilla después de la irradiación, pero las procedentes de los fibroblastos XPG no muestran esta reducción. ¿Cuál puede ser la causa?

Si suponemos que un sistema de reparación por escisión de nucleótido es operativo en los fibroblastos, ¿qué etapa puede ser defectuosa en los fibroblastos de los pacientes con XPG? Justificar la respuesta.

16. Reparación Directa. La lesión O^6-meG se repara normalmente por una transferencia directa del grupo metil a la proteína O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa. Para la secuencia de nucleotidos AAC(O^6-meG)TGCAC, que incluye la lesión (metilación) del residuo G, Cual seria la secuencia de las dos hebras de las dos DNA-doble hebra resultantes de la replicación en las siguientes situaciones?

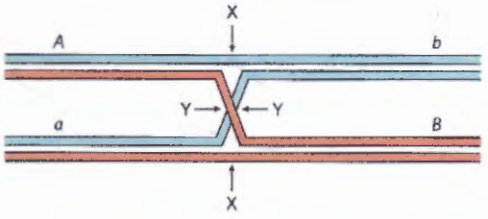
(a) La replicación ocurre antes de la reparación.

(b) La reparación ocurre después de la reparación.

(c) Dos rondas de reparación ocurren después de la reparación.

17. Intermedios de Holliday ¿En qué difiere la formación de los intermedios de Holliday en la recombinación genética homóloga y en la recombinación específica de sitio?

18. Corte de los intermedios de Holliday Un intermedio de Holliday se forma entre dos cromosomas homólogos, en un punto entre los genes *A* y *B*, tal como se muestra a continuación. Los cromosomas tienen diferentes alelos de los dos genes (*A* y *a*, *B* y *b*). Dónde habría que cortar el intermedio de Holliday (puntos X y/o Y) para generar un cromosoma que fuese portador (a) de un genotipo *Ab* o (b) de un genotipo *ab*?



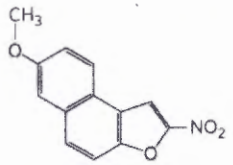
19. Conexión entre replicación y recombinación específica de sitio La mayoría de cepas salvajes de *Saccharomyces cerevisiae* contienen múltiples copias del plásmido circular 2µ (llamado así porque su longitud de contorno es de 2µ), con unos 6.300 pb de DNA. El plásmido usa para su replicación el sistema de replicación del huésped, bajo el mismo estricto control que los cromosomas del huésped, replicándose una sola vez por ciclo celular. La replicación del plásmido es bidireccional, con el inicio de ambas horquillas de replicación en único origen bien definido. Sin embargo, un ciclo de

replicación del plásmido 2μ puede dar más de dos copias del plásmido, lo que resulta en la amplificación del número de copias del plásmido (número de copias del plásmido por célula) siempre que la segregación del plásmido en la división celular genere una célula hija con menos copias que las normales. La amplificación requiere un sistema de recombinación específico de sitio codificado por el plásmido, que sirve para invertir una parte del plásmido en relación a la otra. Explique por qué una inversión específica de sitio podría dar lugar a la amplificación del número de copias del plásmido. (Sugerencia: Considere la situación en la que las horquillas de replicación han duplicado un sitio de recombinación, pero no el otro.)

Problema de análisis de datos

20. Mutagénesis en *Escherichia coli* Muchos compuestos mutagénicos actúan alquilando las bases del DNA. El compuesto alquilante R7000 (7-metoxi-2-nitronaftol[2,1-*b*]furano) es un mutágeno extremadamente potente.

R7000

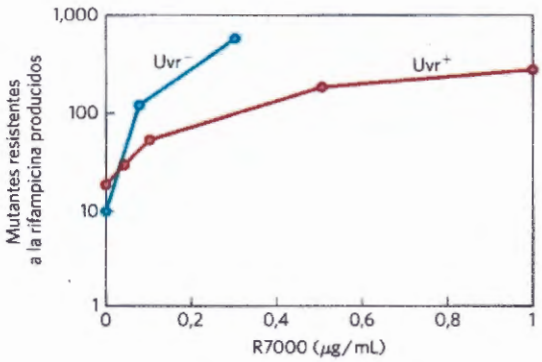


R7000

In vivo, el R7000 es activado por el enzima nitrorreductasa y esta forma más reactiva se une covalentemente al DNA, principalmente, pero no exclusivamente, a los pares de bases G≡C.

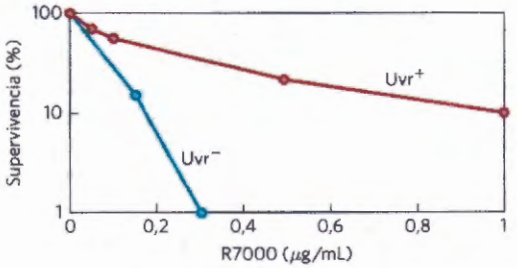
En un trabajo de 1996, Quillardet, Touati y Hofnung exploraron los mecanismos por los que el R7000 causa mutaciones en *E. coli*. Compararon la actividad genotóxica de R7000 en dos cepas de *E. coli*: el tipo salvaje (uvr⁺) y mutantes carentes de actividad *uvrA* (Uvr⁻; véase la Tabla 25-6). En primer lugar midieron las tasas de mutagénesis. La rifampicina es un inhibidor de la RNA polimerasa (véase el Capítulo 26). En su presencia, las células no crecen a menos que ciertas mutaciones ocurran en el gen que codifica la RNA polimerasa; la aparición de colonias resistentes a la rifampicina es un fiel reflejo de las tasas de mutación.

Se determinaron los efectos de diferentes concentraciones de R7000, con los resultados mostrados en la gráfica siguiente.



(a) ¿Por qué aparecen algunos mutantes incluso en ausencia de R7000?

Quillardet y colaboradores también midieron la tasa de supervivencia de bacterias tratadas con diferentes concentraciones de R7000.



(b) Explique por qué el tratamiento con R7000 es letal para las células?

(c) Explique las diferencias entre las curvas de mutagénesis y las curvas de supervivencia para los dos tipos de bacterias, Uvr⁺ y Uvr⁻ tal como se muestra en las gráficas.

Los investigadores midieron a continuación la cantidad de R7000 unido covalentmente al DNA en *E. coli* Uvr⁺ y Uvr⁻. Incubaron bacterias con [³H]R7000 durante 10 o 70 minutos, extrajeron el DNA y midieron su contenido en [³H] en cuentas por minuto (cpm) por μg de DNA.

	³H en el DNA (cpm/μg)	
Tiempo	**Uvr⁺**	**Uvr⁻**
10	76	159
70	69	228

(d) Explique por qué la cantidad de ³H disminuye con el tiempo en la cepa Uvr⁺ y aumenta con el tiempo en la cepa Uvr⁻.

A continuación, Quillardet y colaboradores examinaron los cambios concretos de la secuencia del DNA causados por el R7000 en las bacterias Uvr⁺ y Uvr⁻. Para ello, usaron seis cepas diferentes de *E coli*, cada una con una mutación puntual diferente en el gen *lacZ*, que codifica la β-galactosidasa (este enzima cataliza la misma reacción que la lactasa; véase la Fig. 14-11). Las células con cualquiera de estas mutaciones tienen una β-galactosidasa no funcional por lo que son incapaces de metabolizar lactosa (es decir, un fenotipo Lac⁻). Cada tipo de mutación puntual requería una mutación inversa específica para restablecer la función génica de *lacZ* y el fenotipo Lac⁺. La siembra de las células en un medio con lactosa como única fuente de carbono hizo posible seleccionar estas células Lac⁺ con mutaciones inversas. La frecuencia de cada tipo de mutación se pudo calcular a partir del número de células Lac⁺ después de la mutación de una cepa determinada.

Primero examinaron el espectro de mutaciones en las células Uvr⁻. La tabla a continuación muestra los resultados para seis cepas, de CC101 a CC106 (con la mutación puntual necesaria para producir células Lac⁺ indicada entre paréntesis).

COPY-STATION

Número de células Lac⁺ (promedio ± SD)

R7000 (μg/mL)	CC101 (A=T hasta C≡G)	CC102 (G≡C hasta A=T)	CC103 (G≡C hasta C≡G)	CC104 (G≡C hasta T=A)	CC105 (A=T hasta T=A)	CC106 (A=T hasta G≡C)
0	6 ± 3	11 ± 9	2 ± 1	5 ± 3	2 ± 1	1 ± 1
0.075	24 ± 19	34 ± 3	8 ± 4	82 ± 23	40 ± 14	4 ± 2
0.15	24 ± 4	26 ± 2	9 ± 5	180 ± 71	130 ± 50	3 ± 2

(e) ¿Qué tipos de mutación muestran aumentos significativos por encima de la tasa de referencia debido al tratamiento con R7000? Dé una explicación plausible de por qué algunos tienen frecuencias más altas que otros.

(f) ¿Pueden explicarse todas las mutaciones indicadas en (e) como una consecuencia de la unión covalente de R7000 a un par de bases G≡C? Explique su razonamiento.

(g) La Figura 25-27b explica cómo la metilación de los residuos de guanina puede dar lugar a una mutación de G≡C a A=T. Usando una ruta similar, muestre de qué modo la unión de R7000 podría dar lugar a las mutaciones de G≡C a A=T o T=A mostradas anteriormente. ¿Qué base se aparea con el grupo R7000?

Los resultados con las bacterias Uvr⁺ se muestran en la tabla siguiente.

Número de células Lac⁺ (promedio ± SD)

R7000 (μg/mL)	CC101 (A=T hasta C≡G)	CC102 (G≡C hasta A=T)	CC103 (G≡C hasta C≡G)	CC104 (G≡C hasta T=A)	CC105 (A=T hasta T=A)	CC106 (A=T hasta G≡C)
0	2 ± 2	10 ± 9	3 ± 3	4 ± 2	6 ± 1	0,5 ± 1
1	7 ± 6	21 ± 9	8 ± 3	23 ± 15	13 ± 1	1 ± 1
6	4 ± 3	15 ± 7	22 ± 2	68 ± 25	67 ± 14	1 ± 1

(h) ¿Indican estos resultados que todos los tipos de mutaciones son reparados con igual fidelidad? Proporcione una explicación plausible para su respuesta.

Referencia

Quillardet, P., E. Touati, and M. Hofnung. 1996. Influence of the *uvr*-dependent nucleotide excision repair on DNA adducts formation and mutagenic spectrum of a potent genotoxic agent: 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan (R7000). *Mutat. Res.* 358:113–122.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 26

Metabolismo del RNA

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA 1028

26.2 Maduración del RNA 1039

26.3 Síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA 1055

La expresión de la información genética requiere, generalmente, la síntesis de una molécula de RNA, transcrita a partir de un molde de DNA. A primera vista, las cadenas de RNA y de DNA pueden parecer similares, con el grupo hidroxilo en posición 2' de la aldopentosa y la sustitución normalmente de la timina por uracilo como únicas diferencias. Sin embargo, al contrario del DNA, la mayoría de RNA desempeñan sus funciones en forma de cadena sencilla. Estas cadenas se pliegan sobre sí mismas y poseen el potencial para una diversidad estructural mucho más amplia que la observada en el DNA (Capítulo 8). El RNA está, de este modo, capacitado para desempeñar una amplia variedad de funciones celulares.

El RNA es la única macromolécula conocida que tiene a la vez funciones en el almacenamiento y la transmisión de la información y en la catálisis, lo cual ha originado muchas discusiones acerca de su posible papel como intermediario químico esencial en el desarrollo de la vida en nuestro planeta. El descubrimiento de los RNA catalíticos, o ribozimas, ha cambiado la propia definición de enzima, extendiéndola más allá del dominio de las proteínas. De todas formas, las proteínas siguen siendo importantes para el RNA y sus funciones. En la biosfera actual, todos los ácidos nucleicos, incluido el RNA, forman complejos con proteínas. Algunos de estos complejos constituyen maquinarias moleculares muy elaboradas, en las que el RNA puede asumir funciones estructurales y catalíticas.

Con la excepción de los genomas de RNA de ciertos virus, todas las moléculas de RNA se forman a partir de información almacenada permanentemente en el DNA. Durante la **transcripción**, un sistema enzimático convierte la información genética de un segmento de DNA de doble cadena en una cadena de RNA con una secuencia de bases complementaria de una de las cadenas del DNA. Existen tres clases principales de RNA. Los **RNA mensajeros (mRNA)** codifican la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos especificados por un gen o por un conjunto de genes. Los **RNA de transferencia (tRNA)** leen la información codificada en el mRNA y transfieren el aminoácido adecuado a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis proteica. Los **RNA ribosómicos (rRNA)** forman parte de los ribosomas, complejas maquinarias celulares que sintetizan las proteínas. Muchos otros RNA especializados tienen funciones reguladoras o catalíticas o son precursores de las tres clases principales de RNA. Estos RNA con función especializada han dejado de considerarse como especies secundarias del catálogo de RNA celulares. En los vertebrados, los RNA que no pertenecen a una de las categorías clásicas (mRNA, tRNA, rRNA) son ampliamente mayoritarios.

En la replicación normalmente se copia el cromosoma entero, mientras que la transcripción es más selectiva. En un momento dado, sólo se transcriben genes o grupos de genes determinados y algunas regiones del genoma nunca son transcritas. La célula restringe la expresión de la información genética a la formación de los productos génicos necesarios en cada momento. Secuencias reguladoras específicas indican el principio y el final de los segmentos de DNA que han de ser transcritos y designan qué cadena del dúplex de DNA se ha de utilizar como molde. La regulación de la transcripción se describe en detalle en el Capítulo 28.

El conjunto de todas las moléculas de RNA producidas en una célula en unas condiciones determinadas se denomina **transcriptoma** celular. Dada la proporción relativamente pequeña del genoma humano dedicada a genes que codifican proteínas, podríamos suponer que sólo se transcribe una pequeña parte del genoma humano. No es este el caso. El análisis moderno de los patrones de transcripción ha demostrado que una gran parte del genoma del hombre y otros mamíferos se transcribe en RNA. Los productos no son principalmente mRNA, tRNA o rRNA, sino diversos RNA con funciones especializadas de los que se está descubriendo un gran número. Muchos parecen estar implicados en la regulación de la expresión génica; sin embargo, debido a la gran velocidad a la que se están produciendo nuevos descubrimientos debemos admitir que desconocemos cuál es la función de muchos de estos RNA.

COPY STATION

En este capítulo examinamos la síntesis de RNA sobre el molde de DNA y la maduración postsintética y el recambio de las moléculas de RNA. También describiremos muchas de las funciones especializadas del RNA, incluidas las funciones catalíticas. Es de destacar que los sustratos de los enzimas de RNA son a menudo otras moléculas de RNA. También describiremos los sistemas en los que el RNA es el molde y el DNA el producto, y no al revés, como es habitual. Las rutas de la información cierran así el círculo, mostrando que la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de un molde obedece a reglas generales, independientemente de la naturaleza del molde o del producto (RNA o DNA). El examen de la interconversión biológica del DNA y el RNA como portadores de información plantea inevitablemente la discusión acerca del origen de la información biológica.

26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA

Comenzaremos el examen de la síntesis del RNA con la comparación entre la transcripción y la replicación del DNA (Capítulo 25). La transcripción se parece a la replicación en su mecanismo químico fundamental, la polaridad (dirección de la síntesis) y la utilización de un molde. Al igual que la replicación, la transcripción tiene fases de iniciación, elongación y terminación. En la literatura sobre transcripción, la iniciación se subdivide en fases distintas de unión al DNA e inicio de la síntesis de RNA. La transcripción difiere de la replicación en que no requiere un cebador y, generalmente, estar limitada a segmentos de la molécula de DNA. Además, dentro de los segmentos transcritos sólo una de las hebras del DNA sirve de molde para una molécula de RNA determinada.

El RNA es sintetizado por RNA polimerasas

El descubrimiento de la DNA polimerasa y su dependencia de un molde de DNA fue un estímulo para la búsqueda de un enzima que sintetizase RNA complementario de una hebra de DNA. Hacia 1960, cuatro grupos de investigación independientes detectaron un enzima en extractos celulares que era capaz de formar un polímero de RNA a partir de ribonucleósidos 5'-trifosfato. Investigaciones posteriores con la RNA polimerasa purificada de *Escherichia coli* contribuyeron a definir las propiedades fundamentales de la transcripción (**Fig. 26-1**). La **RNA polimerasa dependiente de DNA** requiere, además de un molde de DNA, los cuatro ribonucleósidos 5'-trifosfato (ATP, GTP, UTP y CTP) como precursores de las unidades nucleotídicas del RNA y también Mg^{2+}. La proteína además une un Zn^{2+}. La química y el mecanismo de síntesis del RNA tiene mucho en común con la síntesis de DNA por las DNA polimerasas (véase la Fig. 25.5a). La RNA polimerasa alarga una cadena de RNA añadiendo ribonucleótidos al extremo 3'-hidroxilo y sintetiza el RNA en direc-

COPY-STATION

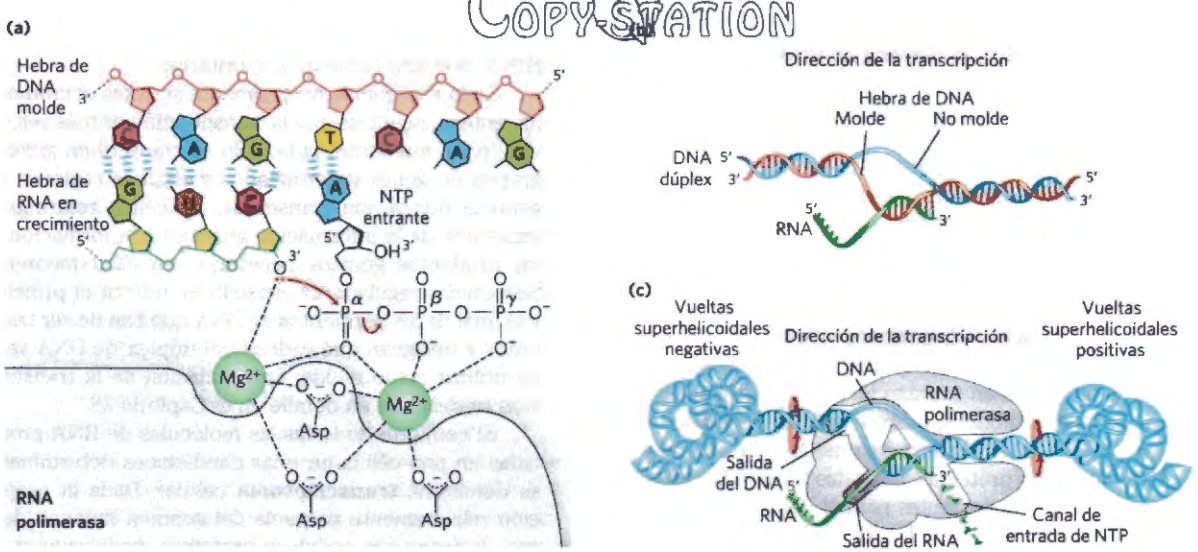


FIGURA DE MECANISMO 26-1 Transcripción por la RNA polimerasa en *E. coli*. Para sintetizar una hebra de RNA complementaria de una de las dos hebras del DNA, el DNA se desenrolla temporalmente. **(a)** Mecanismo catalítico de síntesis de RNA por la RNA polimerasa. Observe que se trata esencialmente del mismo mecanismo usado por la DNA polimerasa (véase la Fig. 25-5a). La reacción emplea dos iones Mg^{2+}, coordinados con los grupos fosfato de los nucleósidos trifosfato entrantes (NTP) y con tres residuos Asp, que están muy conservados en las RNA polimerasas de todas las especies. Uno de los iones Mg^{2+} facilita el ataque por el grupo 3'-hidroxilo del fosfato α del NTP, el otro ión Mg^{2+} facilita el desplazamiento del pirofosfato Ambos iones metálicos estabilizan el estado de transición pentacovalente.

(b) En todo momento unos 17 pb del DNA se encuentran desenrollados. La RNA polimerasa y la burbuja de transcripción se mueven de izquierda a derecha a lo largo del DNA tal como se muestra, con lo que facilitan la síntesis de RNA. El DNA se desenrolla por delante y se subenrolla por detrás, a medida que se transcribe el RNA. A medida que el DNA vuelve a enrollarse, el híbrido RNA-DNA se desplaza y se expulsa la hebra de RNA.

(c) El movimiento de una RNA polimerasa a lo largo del DNA tiende a crear vueltas superhelicoidales positivas (DNA sobrenrollado) por delante de la burbuja de transcripción y vueltas superhelicoidales negativas (DNA subenrollado) por detrás de la misma. La RNA polimerasa se encuentra en estrecho contacto con el DNA por delante de la burbuja de la transcripción, así como con las hebras de DNA separadas y el RNA dentro e inmediatamente detrás de la burbuja. Los nuevos NTP son canalizados a través de un conducto que desemboca en el sitio activo. La huella de la polimerasa abarca unos 35 pb de DNA durante la elongación.

(5') CGCTATAGCGTTT (3') Hebra no molde (codificante) de DNA
(3') GCGATATCGCAAA (5') Hebra molde de DNA
(5') CGCUAUAGCGUUU (3') Transcrito de RNA

FIGURA 26-2 Cadenas molde y no molde (codificante) del DNA. Las dos cadenas complementarias del DNA se definen por su función en la transcripción. El transcrito de RNA se sintetiza sobre la hebra molde siendo idéntica en secuencia (con U en lugar de T) a la hebra no molde, o hebra codificante.

ción 5'→3'. El grupo 3'-hidroxilo actúa como nucleófilo, atacando al fosfato α del ribonucleósido trifosfato entrante (Fig. 26-1a) y liberando pirofosfato. La reacción global es

$$\underset{\text{RNA}}{(\text{NMP})_n} + \text{NTP} \longrightarrow \underset{\text{RNA alargado}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{PP}_i$$

La RNA polimerasa requiere DNA para su actividad, siendo más activa cuando se encuentra unida a un DNA bicatenario. Como se ha indicado anteriormente, sólo se utiliza una de las dos hebras del DNA como molde. La hebra molde de DNA se copia en dirección 3'→5' (antiparalela a la nueva cadena de RNA), tal como sucede en la replicación del DNA. Cada nucleótido en el RNA recién formado se selecciona según las interacciones de apareamiento de bases de Watson y Crick; los residuos de U se insertan en el RNA para aparearse con residuos de A en el DNA molde, los residuos de G se insertan para aparearse con residuos de C, y así sucesivamente. La geometría de los pares de bases (véase la Fig. 25-6) también puede jugar un papel en la selección de las bases.

A diferencia de la DNA polimerasa, la RNA polimerasa no requiere un cebador para iniciar la síntesis. El inicio se produce cuando la RNA polimerasa se une a secuencias específicas de DNA denominadas promotores (descritos más adelante). El grupo 5'-trifosfato del primer residuo molécula de RNA naciente (de nueva síntesis) no es cortado para liberar PPi, sino que se mantiene intacto durante toda la transcripción. En la fase de elongación de la trascripción, el extremo en crecimiento de la nueva cadena de RNA se aparea temporalmente con el DNA molde para formar una doble hélice híbrida RNA-DNA corta, de una longitud de aproximadamente 8 pares de bases (Fig. 26-1b). El RNA en este dúplex híbrido se "despega" poco después de su formación y se restablece el dúplex de DNA.

Para permitir que la RNA polimerasa sintetice una cadena de RNA complementaria de una de las hebras del DNA, el dúplex de DNA se ha de desenrollar a lo largo de una corta distancia, formando una "burbuja" de transcripción. Durante la transcripción, la RNA polimerasa de *E. coli* mantiene generalmente unos 17 pb desenrollados. El híbrido de RNA-DNA de 8 pb se encuentra en esta región desenrollada. La elongación de los transcritos por la RNA polimerasa de *E. coli* transcurre a una velocidad de unos 50 a 90 nucleótidos por segundo. La estructura helicoidal del DNA obliga a una rotación considerable de las hebras de las moléculas de ácido nucleico durante el movimiento de las burbujas de transcripción. La rotación de las hebras del DNA está restringida en la mayor parte de los DNA por proteínas de unión a DNA y por otras barreras estructurales. Por ello el movimiento de la RNA polimerasa genera ondas de vueltas superhelicoidales positivas por delante de la burbuja de transcripción y de vueltas superhelicoidales negativas por detrás (Fig. 26-1c). Este fenómeno se ha observado tanto in vitro como in vivo (en bacterias). En la célula, la acción de las topoisomerasas alivia los problemas topológicos ocasionados por la transcripción (Capítulo 24).

›› Convención clave: Las dos hebras de DNA complementarias tienen papeles diferentes en la transcripción. La hebra que sirve de molde para la síntesis de RNA se denomina **hebra molde**. La hebra de DNA complementaria del molde, la **hebra no molde** o **hebra codificante**, es idéntica en secuencia de bases al RNA transcrito a partir del gen, con U en el RNA en lugar de T en el DNA **(Fig. 26-2)**. La secuencia codificante de un gen particular puede estar situada en cualquiera de las dos hebras de un determinado cromosoma (tal como se muestra en la **Fig. 26-3** para un virus). Las secuencias reguladoras que controlan la transcripción (descritas más adelante en este capítulo) se designan convencionalmente por las secuencias de la hebra codificante. ‹‹

La RNA polimerasa dependiente de DNA de *E. coli* es un enzima complejo y de gran tamaño con cinco subunidades núcleo ($\alpha_2\beta\beta'\omega$; M_r 390.000) y una sexta subunidad, perteneciente al grupo denominado σ, cuyas

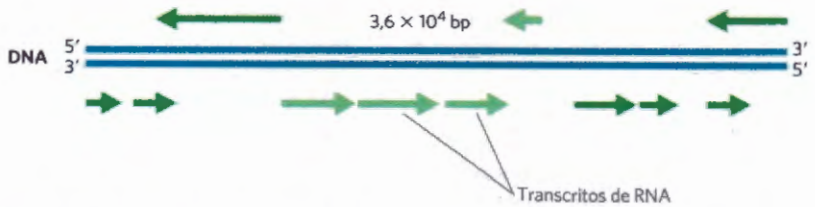


FIGURA 26-3 Organización de la información codificante en el genoma del adenovirus. La información genética del genoma de los adenovirus (un ejemplo convenientemente sencillo) está codificada en una molécula de DNA de doble hebra de 36.000 pb, cuyas dos hebras codifican proteínas. La información para la mayor parte de las proteínas está codificada (es decir es idéntica) en la hebra superior (por convención, la hebra orientada 5' → 3' de izquierda a derecha). La hebra inferior actúa como molde para estos transcritos. Sin embargo, unas pocas proteínas están codificadas en la hebra inferior, que es transcrita en dirección opuesta (y utilizan la hebra superior como molde). La síntesis de los mRNA en los adenovirus es, de hecho, mucho más compleja de lo que se muestra aquí. Muchos de los mRNA que se muestran para la hebra superior como molde se sintetizan inicialmente en forma de un transcrito único y largo (25.000 nucleótidos), que se modifica extensamente para producir los mRNA individuales. Los adenovirus provocan infecciones del tracto respiratorio superior en algunos vertebrados.

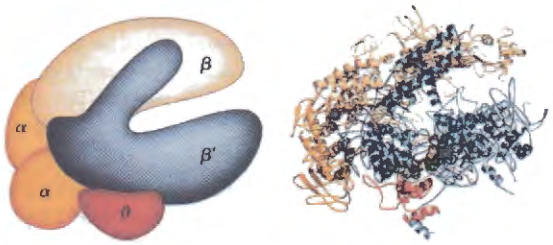


FIGURA 26-4 Estructura del holoenzima de la RNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*. La estructura global de este enzima es muy similar a la de la RNA polimerasa de *E. coli*; el DNA o el RNA no están representados. El conjunto de subnidades de la RNA polimerasa bacteriana tiene la apariencia de una pinza de cangrejo. Las pinzas están formadas por las subunidades β y β' grandes. Las subunidades se muestran en los mismos colores en el esquema y en la estructura de cintas. [Fuente: Estructura de cintas: Información de G. Zhang et al., *Cell* 98:811, 1999, basado en PDB ID 1HQM; L. Minakhin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:892, 2001.2]

variantes se designan por su tamaño (masa nuolecular). La subunidad σ se une transitoriamente a la RNA polimerasa núcleo y dirige el enzima hacia sitios de unión específicos en el DNA (descritos a continuación). Estas seis subunidades constituyen el holoenzima de la RNA polimerasa **(Fig. 26-4)**. Hay pues varias formas del holoenzima de la RNA polimerasa de *E. coli* según el tipo de subunidad σ. La subunidad más común es la σ^{70} (M_r 70.000) y la discusión que sigue a continuación está centrada en el correspondiente holoenzima de la RNA polimerasa.

Las RNA polimerasas carecen de un sitio activo independiente con actividad exonucleasa 3'→5' correctora de pruebas (tal como el que se encuentra en muchas DNA polimerasas), y por ello la tasa de error en la transcripción es mayor que en la replicación del DNA cromosómico, aproximadamente un error por cada 10^4 o 10^5 ribonucleótidos incorporados en el RNA. Dado que de un solo gen se producen muchas copias de RNA y que todos los RNA son finalmente degradados y reemplazados, un error en una molécula de RNA tiene menos consecuencias para la célula que un error en la información permanente almacenada en el DNA. Muchas RNA polimerasas, incluida la RNA polimerasa bacteriana y la RNA polimerasa II eucariótica (estudiada más adelante) se detienen cuando se añade una base no apareada durante la transcripción y pueden eliminar nucleótidos mal apareados del extremo 3' de un transcrito por inversión directa de la reacción de polimerización. Sin embargo, todavía no sabemos si se trata de una auténtica función correctora y en qué medida contribuye a la fidelidad de la transcripción.

La síntesis del RNA empieza en los promotores

El inicio de la síntesis de RNA en puntos al azar de la molécula de DNA sería un proceso sumamente antieconómico. Por el contrario, la RNA polimerasa se une a secuencias específicas del DNA denominadas **promotores**, las cuales dirigen la transcripción de segmentos adyacentes de DNA (genes). Las secuencias de unión de las RNA polimerasas pueden ser muy variadas. La identificación de las secuencias necesarias para la función del promotor ha exigido un gran esfuerzo de investigación.

En *E. coli*, la RNA polimerasa se une a una región que se extiende desde unos 70 pb antes del sitio de inicio de la transcripción hasta unos 30 pb más allá. Por convención, los pares de bases del DNA que corresponden al principio de la molécula de RNA reciben números positivos y los que preceden al sitio de inicio del RNA reciben números negativos. La región del promotor se extiende, pues, de –70 a + 30. El análisis y la comparación de las secuencias de la clase más común de promotores bacterianos (los reconocidos por la RNA polimerasa holoenzima que contiene σ^{70}) ha puesto de manifiesto similitudes en dos cortas secuencias centradas alrededor de las posiciones –10 y –35 **(Fig. 26-5)**. Estas secuencias son sitios de interacción importantes para la subunidad σ^{70}. Las secuencias no son idénticas en todos los promotores bacterianos, pero ciertos nucleótidos que se encuentran con mucha más frecuencia que otros en cada posición forman una **secuencia consenso** (recuerde la secuencia consenso *ori*C de *E. coli*; véase la Fig. 25-10). La secuencia consenso de la región entorno a -10 es (5')TATAAT(3'); la secuencia consenso en la región -35 es (5')TTGACA(3'). Un tercer elemento de reconocimiento rico en AT, denominado elemento UP (promotor corriente arriba), se encuentra entre las posiciones –40 y –60 en los promotores de algunos genes con un nivel de expresión elevado. La subunidad α de la RNA polimerasa se une al elemento UP. La eficacia de unión y de inicio de la transcripción en un promotor por la RNA polimerasa que contiene σ^{70} depende en buena medida de estas secuencias, del espaciado entre ellas y de su distancia del sitio de inicio de la transcripción.

Copy-Station

Numerosas pruebas obtenidas de manera independiente atestiguan la importancia funcional de las secuencias en las regiones –35 y -10. Las mutaciones que alteran la función de un promotor determinado afectan normalmente a uno de los pares de bases en estas regiones. Los cambios en la secuencia consenso también afectan la eficiencia de la unión de la RNA polimerasa y el inicio de la transcripción. El cambio de un solo par de bases puede disminuir la velocidad de inicio en varios órdenes de magnitud. La secuencia del promotor determina, pues, el nivel de expresión basal de los diferentes genes de *E. coli*, que puede ser muy variable. Un método para estudiar la interacción de los promotores con la RNA polimerasa se muestra en el Recuadro 26-1.

La ruta de inicio de la transcripción y el destino de la subunidad σ se conocen cada vez mejor **(Fig. 26-6)**. La ruta consta de dos partes principales, cada una con múltiples etapas. En primer lugar, la polimerasa dirigida por el factor σ unido se asocia al promotor y forma sucesivamente un complejo cerrado (en el que el DNA unido está intacto) y un complejo abierto (en el que el DNA unido está intacto pero parcialmente desenrollado cerca de la secuencia -10). Seguidamente, empieza la transcripción del complejo, que lleva a un cambio conformacional que transforma el complejo en la forma propia de la elongación. El desplazamiento del complejo de transcripción lo aleja del promotor (desalojo del promotor). Cualquiera de estas etapas puede verse afectada por la forma específica de la secuencia del promotor. La subunidad σ se disocia estocásticamente (al azar) cuando la polimerasa entra en la fase de elongación de la transcripción. La proteína NusA (M_r 54.430) se une a

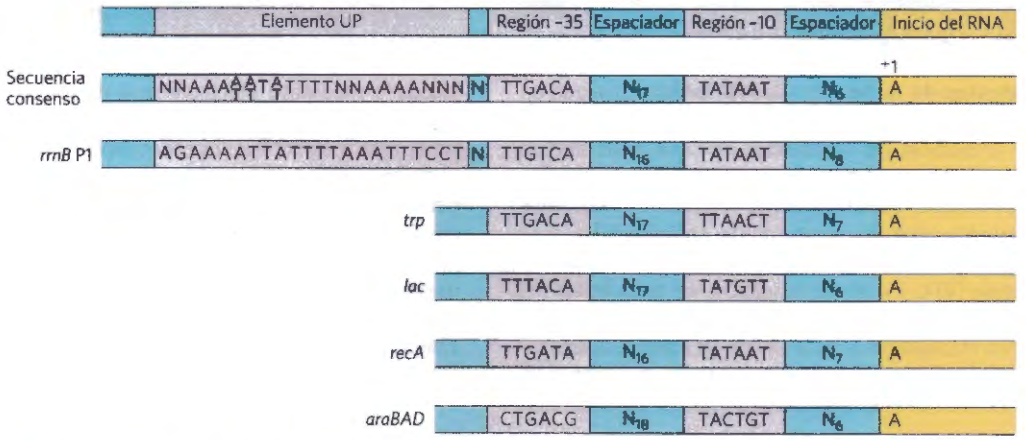


FIGURA 26-5 Promotores típicos de *E. coli* reconocidos por un holoenzima de la RNA polimerasa que contiene σ^{70}. Se muestran secuencias de la hebra no molde que se leen en dirección 5′ → 3′, tal como se acostumbra en representaciones de este tipo. Las secuencias varían de un promotor a otro, pero la comparación de muchos promotores pone de manifiesto similitudes, particularmente en las regiones -10 y -35. La secuencia del elemento UP, que no está presente en todos los promotores de *E. coli*, se muestra para el promotor P1 del gen de rRNA altamente expresado *rrnB*. Los elementos UP se encuentran generalmente en la región entre -40 y -60 y estimulan fuertemente la transcripción de los genes que los contienen. El elemento UP en el promotor de *rrnB* P1 abarca la región entre -38 y -59. La secuencia consenso de los promotores de *E. coli* reconocidos por σ^{70} es la segunda por arriba. Las regiones espaciadoras contienen un número variable de nucleótidos (N). Sólo se muestra el primer nucleótido que codifica el transcrito de RNA (en la posición +1).

la RNA polimerasa implicada en la elongación en competencia con la subunidad σ. Una vez finalizada la transcripción, NusA se disocia del enzima, la RNA polimerasa se disocia del DNA y un factor σ (σ^{70} u otro) puede unirse de nuevo al enzima para iniciar la transcripción.

Tal como está descrito más extensamente en el Capítulo 27, la transcripción de los mRNAs y su traducción están estrechamente ligadas en bacterias. Cuando un gen codificante se está transcribiendo, los ribosomas se unen a él rápidamente y empiezan la traducción del mRNA antes de que su síntesis este completa. Otra proteína, NusG, se une directamente al ribosoma y a la RNA polimerasa, vinculando ambos complejos. El nivel de traducción afecta directamente el nivel de transcripción.

E. coli tiene otras clases de promotores que son reconocidos por los holoenzimas de la RNA polimerasa por medio de subunidades σ diferentes (Tabla 26-1). Un ejemplo son los promotores de los genes del choque térmico. Los productos de este conjunto de genes se producen en mayor cantidad cuando la célula ha sido objeto de una agresión, tal como un aumento brusco de la temperatura. La RNA polimerasa se une a los promotores de estos cuando su subunidad σ^{70} es reemplazada por la subunidad σ^{32} (M_r 32.000), que es específica de los promotores del choque térmico (véase la Fig. 28-3). La utilización de diferentes subunidades σ permite a la célula coordinar la expresión de conjuntos de genes implicados en importantes cambios de la fisiología celular. El conjunto de genes expresados viene determinado por la disponibilidad de las diversas subunidades σ que, a su vez, está determinada por diferentes factores: velocidades reguladas de síntesis y degradación, modificaciones postsintéticas que activan o inactivan las subunidades σ individuales y una clase especializada de proteínas anti-σ, cuyos componentes se unen y secuestran subunidades σ particulares (inutilizándolas para el inicio de la transcripción).

La transcripción está regulada a diferentes niveles

La demanda de los diferentes productos génicos varía según las condiciones imperantes en la célula o el estadio de desarrollo. La transcripción de cada gen está regulada cuidadosamente para suministrar los productos génicos sólo en las proporciones requeridas. Cualquiera de las etapas de la transcripción puede ser regulada, incluyendo la elongación y la terminación. Sin embargo, la unión de la polimerasa y las etapas de inicio de la transcripción, esquematizadas en la Fig. 26-6, son objeto de regulación preferente. Las diferencias en las secuencias del promotor son sólo uno de los diversos niveles de control.

La unión de proteínas a secuencias tanto cerca como lejos del promotor también puede afectar los niveles de expresión génica. La unión de proteínas puede *activar* la transcripción al facilitar la unión de la RNA polimerasa o etapas más alejadas en el proceso de inicio, o *reprimir* la transcripción al bloquear la actividad de la polimerasa. En *E. coli*, una proteína que activa la transcripción es la **proteína receptora dependiente de cAMP (CRP)**, que aumenta la transcripción de genes que codifican los enzimas del metabolismo de azúcares diferentes de la glucosa cuando las células se cultivan en ausencia de glucosa. Los **represores** son proteínas que bloquean la síntesis de RNA en genes específicos. En el caso del represor Lac (Capítulo 28), la transcripción de los genes del metabolismo de la galactosa se bloquea cuando no hay lactosa disponible.

La transcripción es el primer paso de la compleja y energéticamente costosa síntesis proteica; por tanto, la regulación de los niveles de proteína, tanto en células bacterianas como eucarióticas, se realiza en gran parte a nivel de transcripción, sobre todo en sus primeras etapas. En el Capítulo 28 se describen muchos de estos mecanismos de regulación.

RECUADRO 26-1 MÉTODOS La RNA polimerasa deja su huella en un promotor

La **técnica de la huella (footprinting)**, basada en los principios de la secuenciación del DNA, se utiliza para identificar las secuencias de DNA a las que se une una proteína determinada. Se aísla un fragmento de DNA que supuestamente contiene secuencias reconocidas por una proteína de unión al DNA y se marca radiactivamente un extremo de una de las cadenas (Fig. 1). A continuación, se usan reactivos químicos o enzimáticos para introducir roturas al azar en el fragmento de DNA (de promedio, una rotura por molécula). La separación de los productos de corte radiactivos (fragmentos rotos de distintas longitudes) mediante electroforesis de alta resolución produce una "escalera" de bandas radiactivas. En un tubo aparte se repite el procedimiento de corte con el fragmento de DNA original al que se ha unido la proteína. Los dos conjuntos de productos de corte se analizan y comparan por electroforesis. En la "escalera" de bandas radiactivas obtenidas de la muestra que contiene la proteína se observa un hueco o "huella", atribuible al DNA protegido por la proteína unida, que identifica las secuencias reconocidas por la proteína.

Se puede determinar la localización precisa del sitio de unión de la proteína por secuenciación directa (véase la Fig. 8-35) del mismo fragmento de DNA, incluyendo los carriles de secuenciación (no mostrados en esta figura) en el mismo gel que la "huella". En la Figura 2 se muestran los resultados de una "huella" de la fijación de la RNA polimerasa a un fragmento de DNA que contiene un promotor. La polimerasa cubre de 60 a 80 pb; la protección por el enzima unido comprende las regiones -10 y -35.

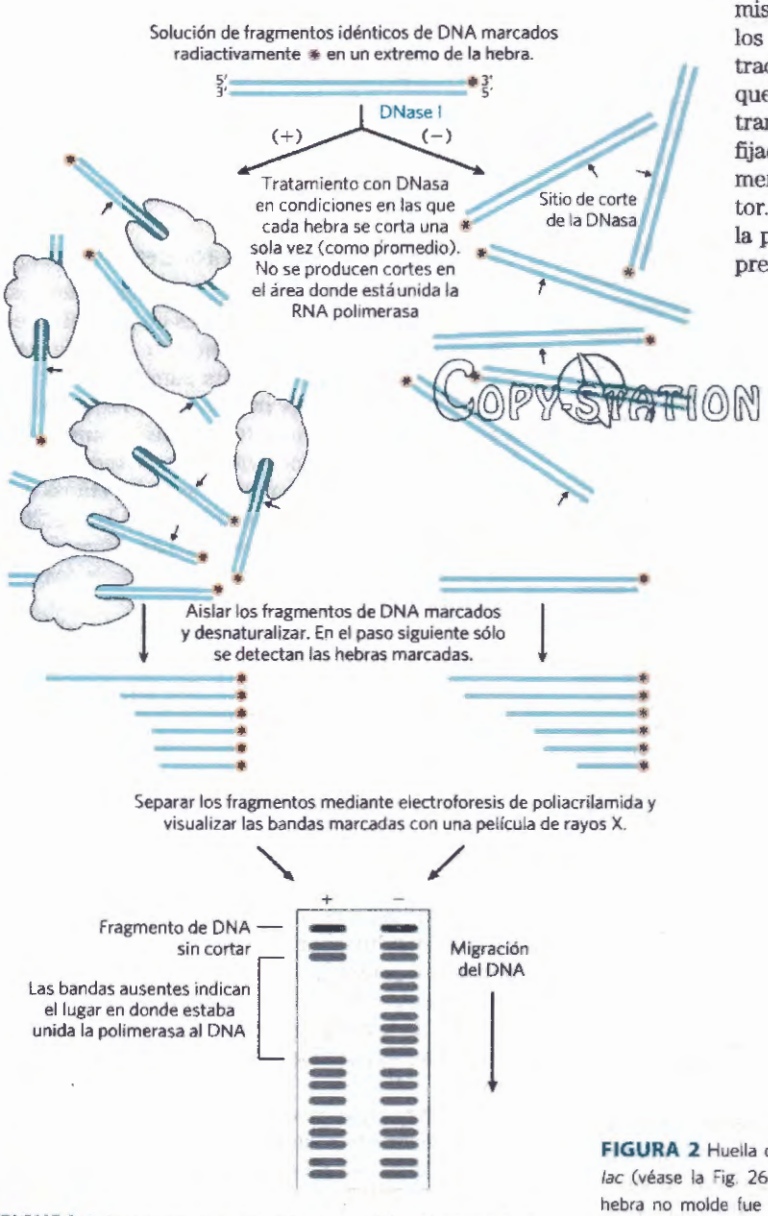


FIGURA 1 Huella del sitio de unión de la RNA polimerasa a un fragmento de DNA. Se realizan experimentos separados en presencia (+) y en ausencia (-) de RNA polimerasa.

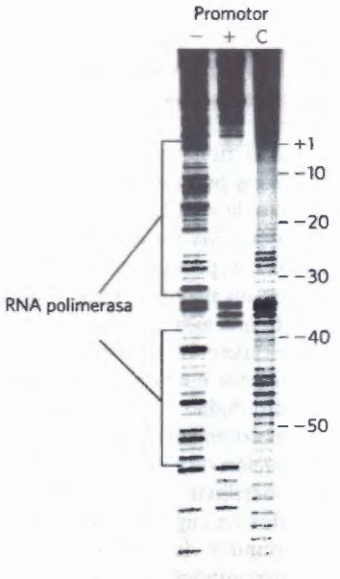


FIGURA 2 Huella de la unión de la RNA polimerasa al promotor *lac* (véase la Fig. 26-5). En este experimento el extremo 5' de la hebra no molde fue marcado con radioactividad. El carril C es un control en el que los fragmentos de DNA marcado han sido cortados con un reactivo químico que produce un patrón de bandas más uniforme.

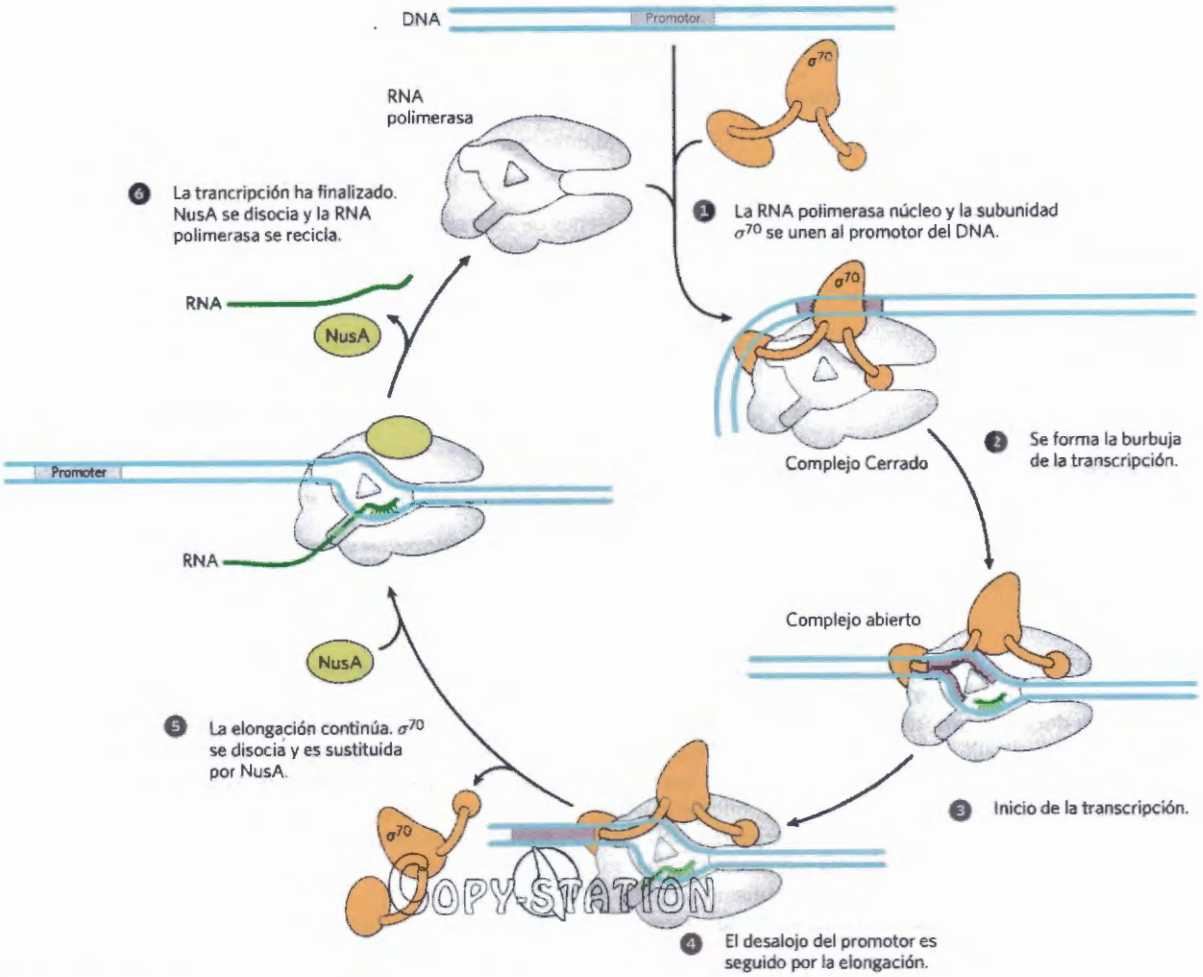


FIGURA 26-6 Inicio y elongación de la transcripción por la RNA polimerasa de *E. coli*. El inicio de la transcripción requiere varios pasos generalmente divididos en dos fases, la unión y el inicio. En la fase de unión, la interacción inicial de la RNA polimerasa con el promotor desemboca en la formación de un complejo cerrado, en el que el DNA promotor está unido de forma estable, pero no está desenrollado. Una región de DNA de 12 a 15 pb, desde dentro de la región -10 hasta la posición +2 o +3, se desenrolla a continuación para formar un complejo abierto. Se han detectado intermedios adicionales (no mostrados) que conducen a los complejos cerrado y abierto, junto con varios cambios conformacionales de las proteínas. La fase de inicio comprende el inicio de la transcripción y el desalojo del promotor (pasos del ❶ al ❹). Una vez comenzada la elongación, se libera la subunidad σ que es reemplazada por la proteína NusA. La polimerasa abandona el promotor y procede a la elongación del RNA (paso ❺). Una vez finalizada la transcripción se libera el RNA, se disocia la proteína NusA y la RNA polimerasa se disocia del DNA (paso ❻). Otra subunidad σ se une a la RNA polimerasa y el proceso empieza de nuevo.

La terminación de la síntesis del RNA está señalizada por secuencias específicas

La síntesis de RNA es procesiva; es decir, la RNA polimerasa introduce un gran número de nucleótidos en la cadena de RNA en crecimiento antes de disociarse. Tiene que ser así necesariamente, porque si una RNA polimerasa liberase un transcrito prematuramente no podría reanudar la síntesis del mismo RNA y debería empezar de nuevo. Sin embargo, al topar con ciertas secuencias de DNA se produce una pausa en la síntesis de RNA y, en algunas de ellas, cesa la transcripción. Nos centraremos de nuevo en los bien estudiados sistemas de las bacterias. *E. coli* posee al menos dos clases de señales de terminación: una clase actúa mediante un factor proteico denominado ρ (rho), mientras que la otra es independiente de ρ.

La mayoría de terminadores independientes de ρ tiene dos características distintivas. La primera es una región cuyo transcrito de RNA tiene secuencias autocomplementarias, que permiten la formación de una estructura en horquilla (véase la Fig. 8-19a) centrada 15 a 20 nucleótidos antes del final de la hebra de RNA. El segundo rasgo es una serie muy conservada de tres residuos A en la hebra molde que se transcriben a residuos U cerca del extremo 3' de la horquilla. Cuando la polimerasa llega a un sitio de terminación con esta estructura, se detiene **(Fig. 26-7a)**. La formación de la estructura en horquilla en el RNA disocia varios pares de bases A=U en el segmento híbrido RNA-DNA y puede desorganizar interacciones importantes entre el RNA y la RNA polimerasa, facilitando de este modo la disociación del transcrito.

Los terminadores dependientes de ρ carecen de la secuencia de residuos A repetidos en la hebra molde, pero a veces contienen una secuencia rica en CA denominada elemento *rut* (*ut*ilización de *r*ho). La proteína ρ

TABLA 26-1 Las siete subunidades σ de *Escherichia coli*

Subunidad σ	Kd (nM)	Moléculas/célula	Relación respecto al holoenzima (%)*	Función
σ^{70}	0,26	700	78	Mantenimiento
σ^{54}	0,30	110	8	Modulación de los niveles celulares de nitrógeno
σ^{38}	4,26	<1	0	Genes de fase estacionaria
σ^{32}	1,24	<10	0	Genes de respuesta al choque térmico
σ^{28}	0,74	370	14	Genes de flagelos y quimiotaxis
σ^{24}	2,43	<10	0	Funciones extracitoplasmáticas; algunas funciones de respuesta al choque térmico
σ^{18}	1,73	<1	0	Funciones extracitoplasmáticas, incluido el transporte de citrato férrico

Procedencia: Adaptado de H. Maeda et al., *Nucleic Acids Res.* 28:3497, 2000.

Observación: los factores σ están ampliamente distribuidos en las bacterias; el número varía de uno solo en *Mycoplasma genitalium* a 63 diferentes en *Streptomyces coelicolor*.

*Número aproximado de cada subunidad σ por célula y la fracción del holoenzima de la RNA polimerasa unida a cada subunidad σ durante el crecimiento exponencial. Las cifras cambian en función de las condiciones de crecimiento. La fracción de RNA polimerasa unida con cada subunidad σ refleja tanto la cantidad de una subunidad particular como su afinidad por el enzima.

se une al RNA en sitios de unión específicos y migra en dirección 5'→3' hasta encontrar el complejo de transcripción detenido en el sitio de terminación (Fig. 26-7b). Una vez allí, contribuye a facilitar la liberación del transcrito de RNA. La proteína ρ posee actividad RNA-DNA helicasa dependiente de ATP, que promueve la translocación de la proteína a lo largo del RNA. El ATP es hidrolizado por la proteína ρ durante el proceso de terminación. Se desconoce el mecanismo detallado de cómo la proteína facilita la liberación del transcrito de RNA.

Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares

La maquinaria de la transcripción en el núcleo de una célula eucariótica es mucho más compleja que la de las bacterias. Los eucariotas tienen tres RNA polimerasas, designadas como I, II y III, que son complejos distintos, pero con algunas subunidades en común. Cada polimerasa tiene una función específica y se fija a secuencias promotoras específicas.

La RNA polimerasa I (Pol I) es responsable de la síntesis de un solo tipo de RNA, un transcrito denominado RNA prerribosómico (o pre-rRNA), que contiene el precursor de los rRNA 18S, 5,8S y 28S (véase la Fig. 26-24). La secuencia de los promotorores de Pol I varía mucho de una especie a otra. La función principal de la RNA polimerasa II (Pol II) es la síntesis de mRNA y de algunos RNA especializados. Este enzima puede reconocer miles de promotores, cuyas secuencias pueden diferir ampliamente. Algunos promotores reconocidos por la Pol II tienen algunas características comunes, entre las que se encuentra la secuencia TATA (secuencia consenso eucariótica TATA(A/T)A(A/T)(A/G)) cerca del par de bases –30 y una secuencia Inr (iniciador) cerca del inicio de trascripción del RNA en +1 **(Fig. 26-8)**. Sin embargo, estos promotores son minoritarios y las complejas interacciones con proteínas reguladoras dirigen la función de Pol II a muchos promotores que carecen de estas características.

La RNA polimerasa III (Pol III) produce los tRNA, el rRNA 5S y algunos RNA especializados de pequeño tamaño. Los promotores reconocidos por Pol III están bien caracterizados. Algunas de las secuencias requeridas para la iniciación regulada de la transcripción por Pol III están localizadas dentro del propio gen, mientras que otras se encuentran en lugares más convencionales corriente arriba del sitio de inicio del RNA (Capítulo 28).

COPY-STATION

La RNA polimerasa II requiere muchos factores proteicos adicionales para su actividad

La RNA polimerasa II es fundamental en la expresión génica eucariótica por lo que ha sido muy estudiada. Aunque esta polimerasa es mucho más compleja que su equivalente bacteriana, la complejidad enmascara una notable conservación de estructura, función y mecanismo. La Pol II aislada de levadura es un enzima con 12 subunidades y con un peso molecular agregado mayor a 510.000. La subunidad mayor (RBP1) muestra un alto grado de homología con la subunidad β' de la RNA polimerasa bacteriana. Otra subunidad (RBP2) es estructuralmente similar a la subunidad β bacteriana y otras dos (RBP3 y RBP11) muestran cierta homología estructural con las subunidades α bacterianas. La Pol II tiene que actuar con genomas más complejos y con moléculas de DNA más cuidadosamente empaquetadas que en las bacterias. Los contactos proteína-proteína con los muchos factores proteicos adicionales requeridos para navegar en este laberinto explican buena parte de la complejidad añadida de la polimerasa eucariótica.

La subunidad mayor de la Pol II (RBP1) también tiene una propiedad poco usual, una cola carboxilo-terminal, consistente en una secuencia consenso de siete aminoácidos, -YSPTSPS-, repetida muchas veces. Hay 27 repeticiones en el enzima de levadura (18 idénticas al consenso) y 52 (21 exactas) en los enzimas de ratón y humanos. Este dominio carboxilo-terminal (CTD) está separado del cuerpo principal del enzima por una secuencia de unión no estructurada. El CTD tiene muchas e importantes funciones en la Pol II, como se describe a continuación.

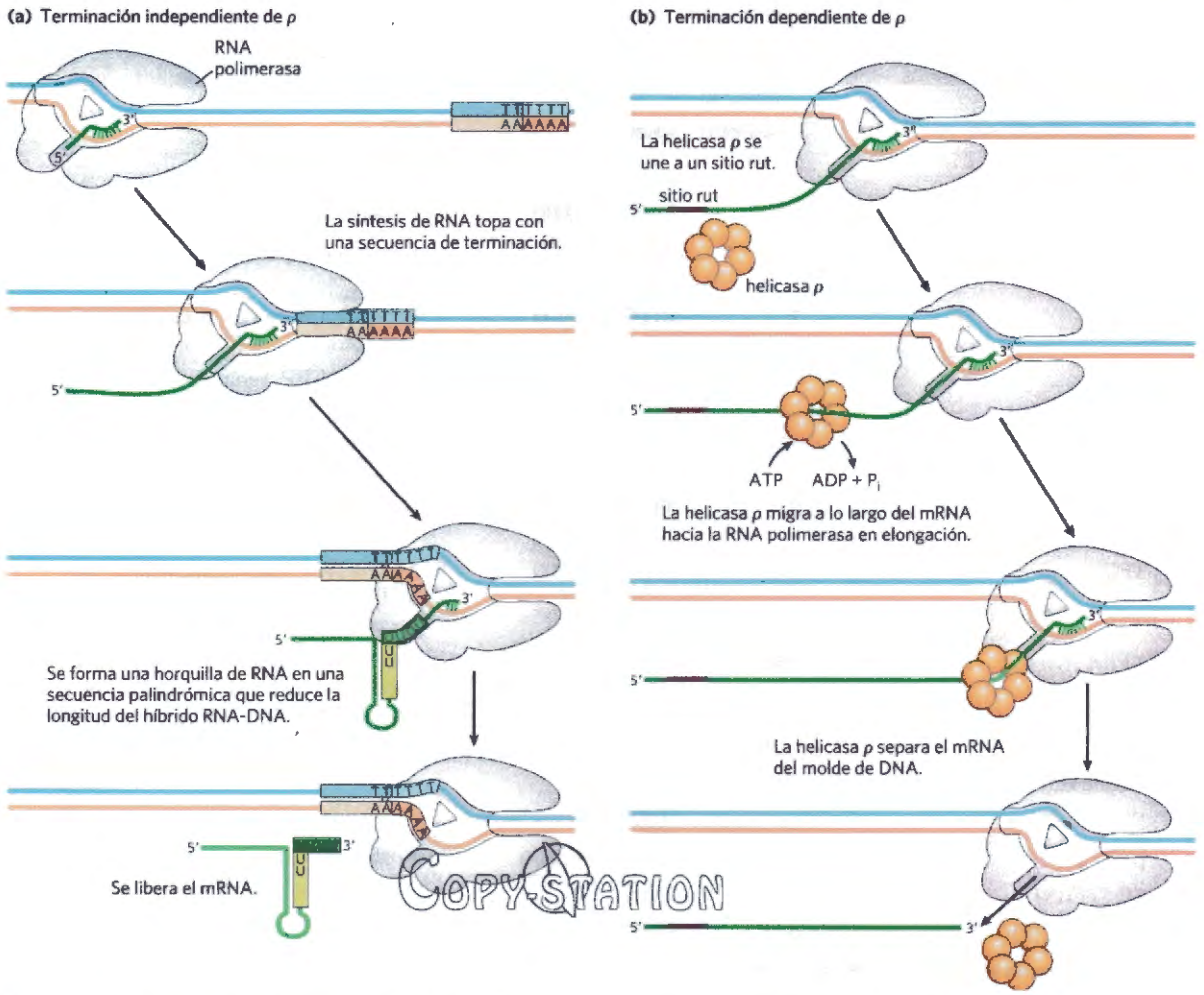


FIGURA 26-7 Terminación de la transcripción en *E. coli*. **(a)** Terminación de la transcripción independiente de ρ. La RNA polimerasa se detiene en diversas secuencias de DNA, algunas de las cuales son terminadores. Hay entonces dos posibilidades: la polimerasa puede ignorar el sitio y continuar su camino o el complejo puede sufrir un cambio conformacional (isomerización). En el último caso, el apareamiento intramolecular de secuencias complementarias en el transcrito de RNA recién sintetizado puede formar una horquilla que disocia el híbrido RNA-DNA o las interacciones entre el RNA y la polimerasa, o ambas, que tiene como resultado la isomerización. Una región híbrida A=U en el extremo 3′ del nuevo transcrito es relativamente inestable y el RNA se disocia completamente del complejo, dando lugar a la terminación. Este es el desenlace habitual en los terminadores. En otros sitios de pausa, el complejo puede escapar después del paso de isomerización para continuar la síntesis de RNA. **(b)** Terminación de la transcripción dependiente de ρ. Los RNA que contienen un sitio rut (Rho utilization site) (púrpura) reclutan la helicasa ρ. La helicasa ρ migra a lo largo del mRNA en dirección 5′ → 3′ y lo separa de la polimerasa.



FIGURA 26-8 Algunas secuencias comunes de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa II eucariótica. La secuencia TATA es el principal punto de agrupamiento para las proteínas de los complejos de preinicio de Pol II. El DNA se desenrolla en la secuencia de inicio (Inr) y el sitio de inicio de la transcripción se encuentra normalmente en o muy cerca de esta secuencia. En la secuencia Inr consenso mostrada, N representa cualquier nucleótido; Y, un nucleótido de pirimidina. Otras muchas secuencias sirven de sitios de unión de una amplia variedad de proteínas que afectan a la actividad de Pol II. Estas secuencias son importantes en la regulación de los promotores de la Pol II y varían ampliamente en tipo y número, pero, en general, la complejidad de los promotores eucarióticos es mucho mayor que la mostrada aquí (véase la Fig. 15-25). Muchas están localizadas a unos pocos centenares de pares de bases de la secuencia TATA en el lado 5′; otras pueden encontrarse alejadas miles de pares de bases. Los elementos de secuencia aquí mostrados varían más entre los promotores de la Pol II de los eucariotas que entre los promotores de *E. coli* (Fig. 26-5). La mayoría de promotores de la Pol II carecen de secuencia TATA, de un elemento consenso Inr o de ambos. Alrededor de la secuencia TATA y corriente abajo de Inr (a la derecha según esta representación) puede haber secuencias reconocidas por uno o más factores de transcripción.

TABLA 26-2 Proteínas necesarias para el inicio de la transcripción en los promotores de la RNA polimerasa II (Pol II) de los eucariotas

Proteína de transcripción	Número de subunidades	Subunidades M_r[a]	Funciones
Inicio			
Pol II	12	7.000–220.000	Cataliza la síntesis de RNA
TPB (proteína de unión a TATA)	1	38.000	Reconoce específicamente la secuencia TATA
TFIIA	2	13.000, 42.000	Estabiliza la unión de TFIIB y TBP al promotor
TFIIB	1	35.000	Se une a TBP; recluta el complejo Pol II-TFIIF
TFIID[b]	13–14	14.000–213.000	Necesaria para la iniciación en promotores sin TATA BOX
TFIIE	2	33.000, 50.000	Recluta TFIIH; posee actividades ATPasa y helicasa
TFIIF	2–3	29.000–58.000	Se une fuertemente a Pol II; se une a TFIIB e impide la unión de Pol II a secuencias de DNA inespecíficas
TFIIH	10	35.000–89.000	Desenrolla el DNA en el promotor (actividad helicasa); fosforila Pol II (dentro de CTD); recluta el complejo de reparación por escisión de nucleótido.
Elongación*			
ELL†	1	80.000	
pTEFb	2	43.000, 124.000	Fosforila Pol II (dentro de CTD);
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elongina (SIII)	3	15.000, 18.000, 110.000	

COPY-STATION

[a] La M_r representa las unidades presentes en complejos de células humanas. Algunos componentes tienen tamaños distintos en levadura.

[b] La presencia de múltiples copias de algunas de las subunidades de TFIID eleva el número total de subunidades del complejo hasta 21-22.

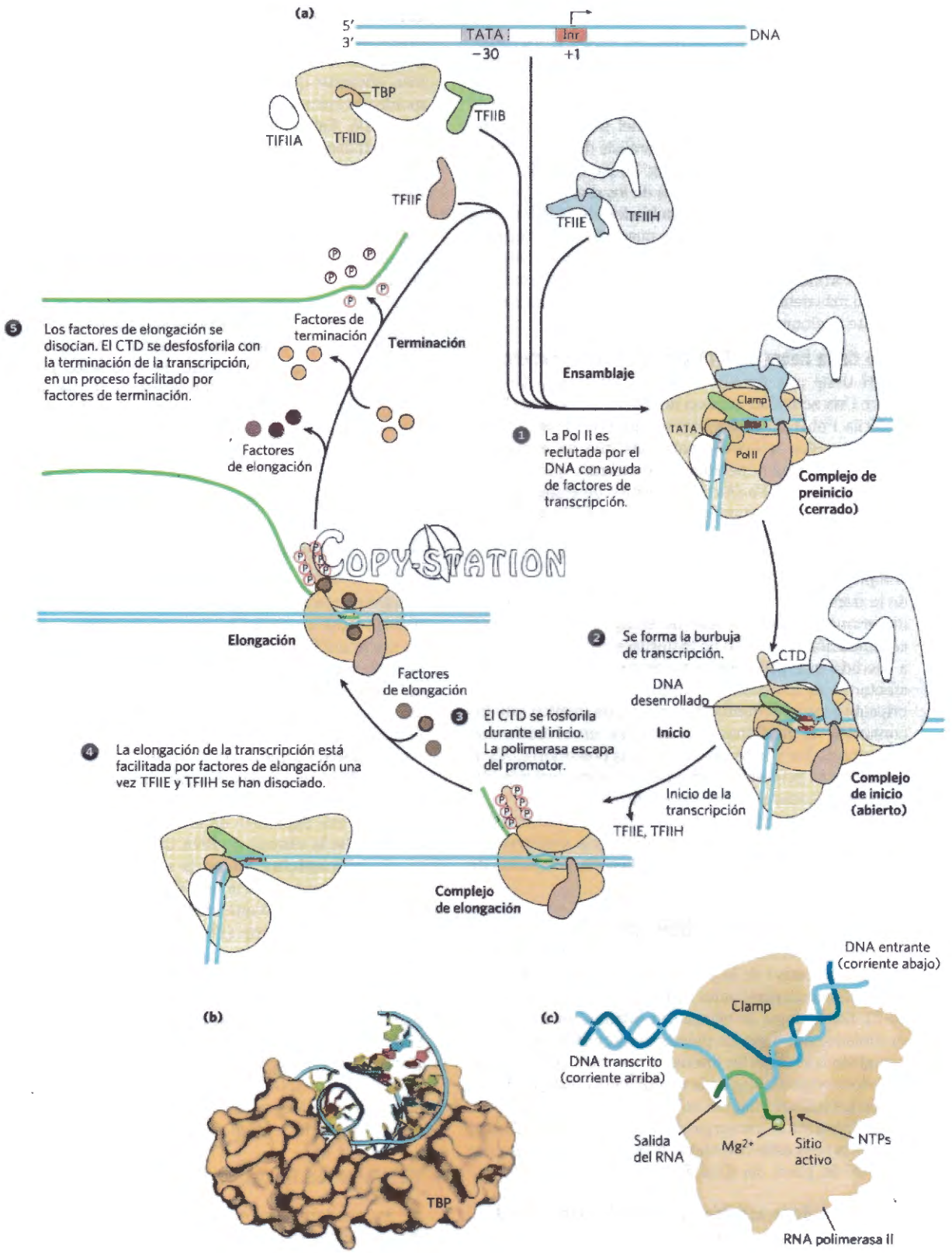
*La función de los factores de elongación es suprimir la pausa o detención de la transcripción del complejo Pol II-TFIIF.

†El nombre se deriva de eleven-nineteen lysine-rich leukemia. El gen del factor ELL es el sitio de acontecimientos de recombinación cromosómicos asociados frecuentemente con la condición cancerosa conocida como leucemia mieloide aguda.

La RNA polimerasa II requiere numerosas proteínas adicionales, denominadas **factores de trascripción,** necesarios para formar el complejo de transcripción activo. Los **factores de transcripción generales,** requeridos en todos los promotores de la RNA polimerasa II (factores habitualmente designados TFII con un identificador adicional), están muy conservados en todos los eucariotas (Tabla 26-2). El proceso de transcripción por la Pol II comprende varias fases: ensamblaje, inicio, elongación, terminación, cada una asociada a proteínas específicas **(Fig. 26-9)**. La vía descrita paso a paso a continuación permite la transcripción in vitro. En la célula, puede que muchas proteínas estén presentes como grandes complejos preformados, lo cual simplificaría las rutas de ensamblaje sobre los promotores. La Figura 26-10 y la Tabla 26-2 son útiles para seguir el destino de los elementos de este proceso.

Ensamblaje de la RNA polimerasa y los factores de transcripción en el promotor La formación de un complejo cerrado comienza cuando la proteína de unión a TATA (TBP) se une a la secuencia TATA (Figs. 26-9a, paso ❶, y 26-9b). En los promotores carentes de secuencia TATA, TBP forma parte de un complejo de múltiples subunidades, denominado TFIID (no mostrado en la Fig. 26-9). Los elementos de secuencia que determinan la unión de TFIID a los promotores sin TATA son mal conocidos. El factor de transcripción TFIIB se une a su vez a TBP y

FIGURA 26-9 Transcripción en los promotores de RNA polimerasa II. TBP (sobretodo con TFIIA y a veces con TFIID) y TFIIB se unen secuencialmente al promotor. TFIIF y Pol II son posteriormente reclutadas a ese complejo. La adición de TFIIE y TFIIH resulta en un complejo cerrado. Dentro del complejo, el DNA se desenrolla en la región Inr por la actividad helicasa de TFIIH, y tal vez de la de TFIIE, que crean un complejo abierto que completa el ensamblaje. El dominio carboxilo-terminal de la subunidad mayor de la Pol II es fosforilado por TFIIH y, a continuación, la polimerasa abandona el promotor y empieza la transcripción. La elongación está acompañada de la liberación de muchos factores de transcripción y también es potenciada por factores de elongación (véase la Tabla 26-2). Después de la terminación, la Pol II es liberada, desfosforilada y reciclada. **(b)** La TPB humana unida al DNA . En este complejo el DNA está curvado dejando abierto el surco menor que permite la unión específica por enlaces de hidrógeno entre la proteína y el DNA. **(c)** Vista de un corte de la elongación de la transcripción promovida por el enzima núcleo Pol II. [Fuente: (b) PDB ID 1TGH, Z.S. Juo et al., *J. Mol. Biol.* 261:239, 1996.]


(a)
5′
3′
TATA
Inr
DNA
−30
+1
TBP
TFIIB
TFIID
TFIIA
TFIIF
TFIIE
TFIIH
Ensamblaje
Clamp
TATA
Pol II
Complejo de preinicio (cerrado)
1 La Pol II es reclutada por el DNA con ayuda de factores de transcripción.
2 Se forma la burbuja de transcripción.
CTD
DNA desenrollado
Inicio
Complejo de inicio (abierto)
Inicio de la transcripción
TFIIE, TFIIH
3 El CTD se fosforila durante el inicio. La polimerasa escapa del promotor.
Factores de elongación
4 La elongación de la transcripción está facilitada por factores de elongación una vez TFIIE y TFIIH se han disociado.
Elongación
Complejo de elongación
5 Los factores de elongación se disocian. El CTD se desfosforila con la terminación de la transcripción, en un proceso facilitado por factores de terminación.
Factores de terminación
Terminación
Factores de elongación
COPY-STATION
(b)
TBP
(c)
DNA entrante (corriente abajo)
Clamp
DNA transcrito (corriente arriba)
Salida del RNA
Mg2+
Sitio activo
NTPs
RNA polimerasa II

también al DNA a ambos lados de TBP. TFIIA se une y junto con TFIIB ayuda a estabilizar el complejo TBP-DNA. TFIIB representa un importante punto de anclaje para la DNA polimerasa II. Otro complejo formado por TFIIF y Pol II se une a continuación al complejo de TFIIB-TBP. TFIIF contribuye a dirigir a la Pol II hacia sus promotores, al interaccionar con TFIIB y reducir la unión de la polimerasa a sitios no específicos del DNA. Finalmente, se unen TFIIE y TFIIH para completar el complejo cerrado. TFIIH tiene diversas subunidades e incluye una actividad actividad DNA helicasa, que promueve el desenrollamiento del DNA cerca del sitio de inicio del RNA (proceso que requiere la hidrólisis de ATP), creándose así un complejo abierto (Fig. 26-9a, paso ❷). Considerando todas las subunidades de los diversos factores (incluyendo TFIIA y las subunidades de TFIID), este complejo de iniciación activado puede estar constituido por más de 50 polipéptidos. Los estudios estructurales de Roger Kornberg y colaboradores han proporcionado una imagen más detallada del núcleo de la RNA polimerasa II durante la elongación (Fig. 26-9c).

Inicio de la hebra de RNA y desalojo del promotor El TFIIH tiene una función adicional durante la fase de inicio. Una actividad quinasa de una de sus subunidades fosforila Pol II en varios lugares del CTD (Fig. 26-9a). Otras proteína quinasas, entre las que se encuentra CDK9 (quinasa 9 dependiente de ciclina), que es parte del complejo pTEFb (factor *b* positivo de elongación de la transcripción), también fosforilan el CTD, principalmente en residuos de Ser de la secuencia repetida del CTD. Ello provoca un cambio conformacional en el complejo global, que tiene como consecuencia el inicio de la transcripción. La fosforilación del CTD también es importante durante la fase de elongación que sigue a continuación. El estado de fosforilación del CTD cambia a medida que progresa la transcripción. Los cambios afectan a las interacciones entre el complejo de transcripción y otras proteínas y enzimas, de manera que los conjuntos de proteínas que se unen en el inicio son distintos de los que se unen en etapas posteriores. Algunas de estas proteínas participan en la maduración del transcrito (como se describe a continuación).

Durante la síntesis de los 60 a 70 nucleótidos iniciales del RNA, se libera primero TFIIE y a continuación TFIIH, mientras que Pol II inicia la fase de elongación de la transcripción.

Elongación, terminación y liberación TFIIF permanece asociado a Pol II durante toda la elongación. Durante esta etapa, la actividad de la polimerasa está muy potenciada por proteínas denominadas factores de elongación (Tabla 26-2). Los factores de elongación, algunos unidos al CTD fosforilado, suprimen las pausas durante la transcripción y también coordinan las interacciones entre los complejos proteicos responsables de la maduración postranscripcional de los mRNA. Una vez se ha completado el transcrito de RNA finaliza la transcripción. La Pol II se desfosforila y se recicla para estar disponible para iniciar otro transcrito (Fig. 26-9a, pasos del ❸ al ❺).

Regulación de la actividad de la RNA polimerasa II La regulación de la transcripción en los promotores reconocidos por Pol II es muy compleja. Intervienen de numerosas proteínas que interaccionan con el complejo de preinicio. Algunas de esas proteínas reguladoras interaccionan con factores de transcripción, otras con la propia Pol II. La regulación de la transcripción se describe con más detalle en el Capítulo 28.

Las diversas funciones de TFIIH En los eucariotas la reparación del DNA dañado (véase la Tabla 25-5) de los genes que están siendo transcritos de forma activa es más eficiente que la de otro DNA dañado y la hebra molde es reparada algo más eficientemente que la hebra no molde. Estas observaciones sorprendentes encuentran explicación en las funciones alternativas de las subunidades del TFIIH. El TFIIH no sólo participa en la formación del complejo cerrado durante la formación del complejo de transcripción (como se ha descrito anteriormente), sino que algunas de sus subunidades son también componentes esenciales del complejo de reparación por escisión de nucleótido (véase la Fig. 25-25).



Cuando Pol II se detiene en una lesión del DNA, el TFIIH puede interaccionar con la lesión y reclutar el complejo completo de reparación por escisión de nucleótido. La pérdida genética de ciertas subunidades de TFIIH puede causar enfermedades en humanos. Algunos ejemplos son el xeroderma pigmentosum (véase el Recuadro 25-1) y el síndrome de Cockayne, caracterizado por retraso del crecimiento, fotosensibilidad y desordenes neurológicos. ■

Copy-station

La RNA polimerasa dependiente de DNA es inhibida selectivamente

La elongación de las cadenas de RNA por la RNA polimerasa tanto en bacterias como en eucariotas es inhibida por el antibiótico **actinomicina D (Fig. 26-10)**. La porción plana de esta molécula se inserta (intercala) en el DNA de doble hélice entre pares de bases G≡C sucesivos, lo que provoca la deformación del DNA. Esto impide el desplazamiento de la polimerasa a lo largo del molde. Debido a que la actinomicina D inhibe la elongación del RNA en células intactas, así como en extractos celulares, resulta muy útil para identificar procesos celulares que dependen de la síntesis de RNA. La **acridina** inhibe la síntesis de RNA de forma similar.

La **rifampicina** inhibe la síntesis de RNA en las bacterias al unirse a la subunidad β de las RNA polimerasas bacterianas, lo que impide el desalojo del promotor en la transcripción (Fig. 26-6). Ocasionalmente se usa como antibiótico.

El hongo *Amanita phalloides* ha desarrollado un mecanismo de defensa muy efectivo frente a los depredadores. Produce **α-amanitina** que impide la formación de mRNA en las células animales al bloquear la Pol II y, a concentraciones más elevadas, también la Pol III. Ni la Pol I ni la RNA polimerasa bacteriana son sensibles a la α-amanitina, como tampoco lo es la propia RNA polimerasa II de *A. phalloides*.

RESUMEN 26.1 Síntesis de RNA dependiente de DNA

■ La transcripción está catalizada por RNA polimerasas dependientes de DNA, que usan ribonucleósidos 5'-trifosfato para sintetizar RNA complementario de la

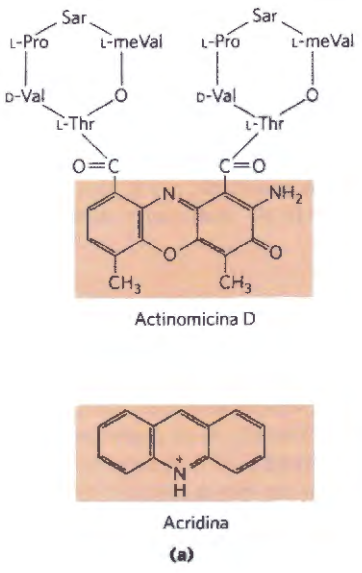




FIGURA 26-10 Actinomicina D y acridina, inhibidores de la transcripción del DNA. **(a)** La porción sombreada de la actinomicina D es plana y se intercala entre dos pares de bases sucesivos G≡C en el DNA dúplex. Las dos estructuras peptídicas cíclicas de la molécula de la actinomicina D se unen al surco menor de la doble hélice. La sarcosina (Sar) es la *N*-metilglicina; meVal representa metilvalina. La acridina también actúa por intercalación en el DNA. **(b)** Complejo de actinomicina D con DNA . El esqueleto del DNA se muestra en azul, las bases en blanco, la parte intercalada de la actinomicina D (sombreada en **(a)**) en naranja y el resto de la actinomicina D en rojo. El DNA está curvado a consecuencia de la unión de la actinomicina. [Fuente: **(b)** PDB ID 1DSC, C. Lian et al., J. Am. Chem. Doc. 118:8791, 1996.]

hebra molde de un dúplex de DNA. La transcripción consta de varias fases: unión de la RNA polimerasa a un sitio del DNA denominado promotor, inicio de la síntesis del transcrito, elongación y terminación.

- La RNA polimerasa bacteriana requiere una subunidad específica para reconocer el promotor. Como primer paso determinante de la transcripción, la unión de la RNA polimerasa al promotor y el inicio de la transcripción están fuertemente regulados. La transcripción se detiene en secuencias denominadas terminadores.
- Las células eucarióticas tienen tres tipos de RNA polimerasas. La unión de la RNA polimerasa II a sus promotores requiere un conjunto de proteínas denominadas factores de transcripción. Los factores de elongación participan en la fase de elongación de la transcripción. La subunidad mayor de la Pol II tiene un largo dominio carboxilo-terminal, que se fosforila durante las fases de inicio y elongación.

26.2 Maduración del RNA

Gran parte de las moléculas de RNA en las bacterias y la práctica totalidad de las moléculas de RNA de los eucariotas son modificadas en mayor o menor medida después de su síntesis. Muchas de las transformaciones moleculares más interesantes del metabolismo del RNA ocurren durante la modificación posterior a la síntesis. Curiosamente, algunos de los enzimas que catalizan estas reacciones están compuestos por RNA en lugar de proteína. El descubrimiento de los RNA catalíticos, o **ribozimas**, ha representado una revolución en las concepciones sobre la función del RNA y sobre el origen de la vida.

Una molécula de RNA recién sintetizada se denomina **trascrito primario**. Seguramente la modificación más importante de los transcritos primarios tenga lugar en los mRNA de los eucariotas y en los tRNA tanto de bacterias como de eucariotas. Los RNA con funciones especializadas también son modificados.

El transcrito primario de un mRNA eucariótico contiene, como es natural, las secuencias que corresponden a un gen, aunque las secuencias que codifican el polipéptido puedan no ser contiguas. Los fragmentos que interrumpen la región codificante del transcrito se denominan intrones y los segmentos codificantes se denominan exones (véase la discusión sobre los intrones y los exones del DNA en el Capítulo 24). En un proceso denominado **corte y empalme (splicing) del RNA**, se eliminan los intrones del transcrito primario y los exones se unen para formar una secuencia continua que especifica un polipéptido funcional. Los mRNA eucarióticos también se modifican en ambos extremos. Un residuo modificado, denominado casquete 5', se añade al extremo 5'. El extremo 3' se corta y se le añaden unos 80 a 250 residuos de A para formar una "cola" de poli(A). Los elaborados complejos proteicos que llevan a cabo estos tres procesos de maduración del RNA no operan independientemente. Parece que están asociados unos con otros y con la CDT fosforilada de la Pol II; cada complejo influye en la función de los otros. Otras proteínas que intervienen en el transporte del mRNA al citoplasma también están asociadas con el mRNA en el núcleo y la modificación del transcrito está acoplada a su transporte. En efecto, un mRNA eucariótico a medida que es sintetizado entra a formar parte de un complejo que consta de docenas de proteínas. La composición del complejo cambia a medida que se modifica el transcrito, se transporta al citoplasma y es cedido a los ribosomas para la traducción. Estos procesos se resumen en la **Figura 26-11** y se describen con mayor detalle a continuación.

Los transcritos primarios de los tRNA de procariotas y de eucariotas también se modifican por eliminación de secuencias de cada extremo (corte) y en unos pocos casos por eliminación de intrones (corte y empalme). También se modifican muchas bases y azúcares de los tRNA; en el tRNA maduro abundan las bases que no se encuentran habitualmente en otros ácidos nucleicos (véase la Fig. 26-22). Muchos de los RNA con función especializada también sufren elaborados procesos de maduración que, a menudo, incluyen la eliminación de segmentos de uno o ambos extremos.

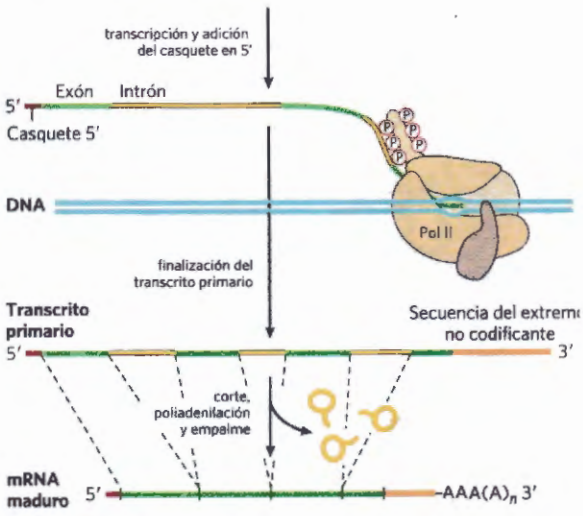


FIGURA 26-11 Formación del transcrito primario y su modificación durante la maduración del mRNA en una célula eucariótica. El casquete 5' (en rojo) se añade antes de que se complete la síntesis del transcrito primario. En naranja se muestra una secuencia terminal no codificante (intrón), a continuación del último exón. El corte y empalme puede tener lugar antes o después de las etapas de corte y poliadenilación. Todos los procesos aquí representados tienen lugar en el núcleo.

El destino final de todos los RNA es la degradación regulada y completa. La velocidad de recambio de los RNA es fundamental para determinar su nivel de estado estacionario y y la velocidad a la que cesa la expresión de un gen cuando su producto ya no es necesario para la célula. Durante el desarrollo de los organismos pluricelulares, por ejemplo, ciertas proteínas se han de expresar solamente en una etapa, por lo que los mRNA que las codifican se han de sintetizar y destruir en el momento adecuado.

Los mRNA eucarióticos poseen un casquete en el extremo 5'

La mayoría de mRNA eucarióticos tienen un **casquete en 5'**, un residuo de 7-metilguanosina unido al residuo 5'-terminal del mRNA a través de un poco común enlace 5',5'-trifosfato **(Fig. 26-12)**. El casquete en 5' ayuda a proteger el mRNA de las ribonucleasas. El casquete también se une a un complejo proteico específico de unión al casquete y participa en la unión del mRNA al ribosoma para iniciar la traducción (Capítulo 27).

El casquete 5' se forma por condensación de una molécula de GTP con el trifosfato del extremo 5' del transcrito. La guanina se metila posteriormente en N-7 y, a menudo, se añaden grupos metilo adicionales en los 2'

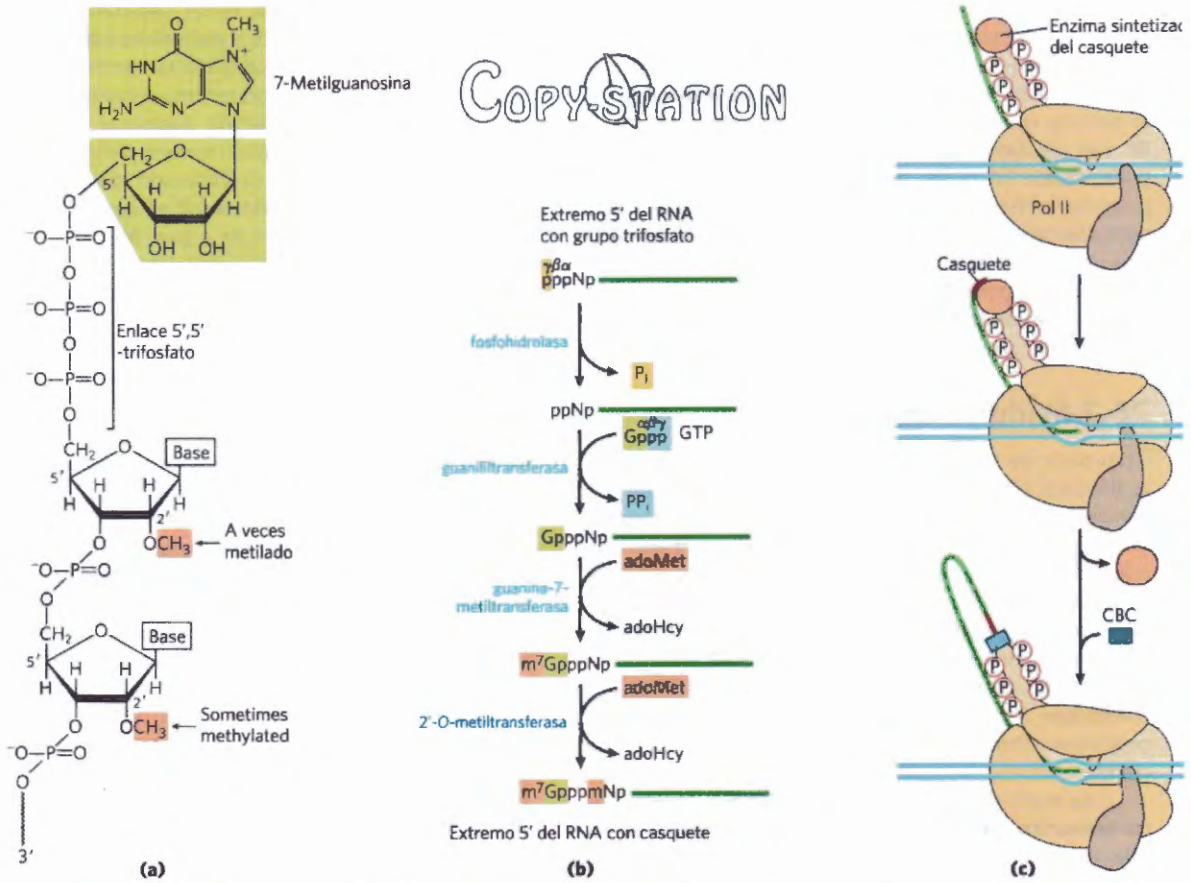


FIGURA 26-12 El casquete en 5' del mRNA. (a) La 7-metilguanosina (m^7G) se une al extremo 5' de casi todos los mRNA eucarióticos con un enlace poco usual 5',5'-trifosfato. Se encuentran a menudo grupos metilo (en rojo) en la posición 2' del primer y segundo nucleótidos. Los RNA de las levaduras carecen de los grupos 2'-metilo. El grupo 2'-metilo del segundo nucleótido generalmente sólo se encuentra en los RNA de las células de vertebrados. **(b)** La formación del casquete en 5' precisa de cuatro a cinco pasos diferentes. (AdoHcy es la abreviatura de S-adenosilhomocisteína). **(c)** La síntesis del casquete la realizan enzimas anclados al CTD a través de la asociación con el complejo de unión al casquete (CBC).

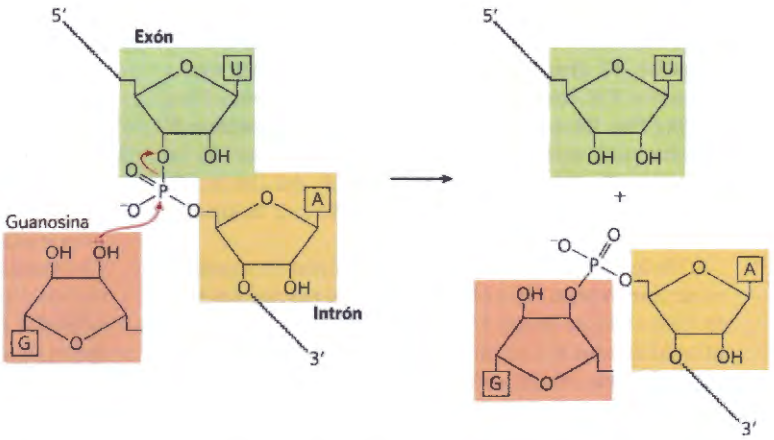


FIGURA 26-13 Reacción de transesterificación. Este es el primer paso en el corte y empalme en dos pasos de los intrones del grupo I. En este ejemplo el 3' OH de una molécula de guanosina actúa de nucleófilo, atacando el enlace fosfodiéster entre los residuos U y A en el límite exón-intrón de una molécula de mRNA (véase la Fig. 26-14).

hidroxilos del primer y segundo nucleótidos adyacentes al casquete (Fig. 26-12a). Los grupos metilo proceden de la *S*-adenosilmetionina. Todas estas reacciones suceden en los primeros estadios de la trascripción, después de añadir los primeros 20 o 30 nucleótidos del transcrito. Los tres enzimas responsables de la inserción del casquete, y por su mediación el extremo 5' del propio transcrito, están asociadas al CTD de la RNA polimerasa II hasta que se sintetiza el casquete. Entonces, el complejo de síntesis del casquete se separa del extremo 5' y éste se une el complejo de unión al casquete (Fig. 26-12c).

El casquete no protege completamente al transcrito. El virus de la gripe tiene un genoma formado por 8 segmentos de RNA monocatenario. Sus genes son transcritos por una RNA polimerasa dependiente de RNA, un heterodímero formado por las subunidades PA, PB1, y PB2. El virus no necesita enzimas especializadas para la síntesis de los casquetes 5' ya que las obtiene de los transcritos del huésped en un proceso llamado "arrebato del casquete" (cap-snatching). Un transcrito del huésped se une a la subunidad PB2 de la polimerasa viral y es posteriormente cortado por la endonucleasa en la subunidad PA. La subunidad PB1 utiliza el oligonucleótido encasquetado como cebador para la síntesis viral del RNA.

Intrones y exones se transcriben del DNA al RNA

En las bacterias, una cadena polipeptídica está codificada, generalmente, por una secuencia de DNA que es colineal con la secuencia de aminoácidos, que se extiende sin interrupción a lo largo del molde de DNA hasta completar la información necesaria para especificar el polipéptido. Sin embargo, la noción de que *todos* los genes son continuos fue desmentida cuando en 1977 Phillip Sharp y Richard Roberts descubrieron, independientemente, que en los eucariotas mucho genes de los polipéptidos están interrumpidos por secuencias no codificantes (intrones).

La inmensa mayoría de los genes de los vertebrados contienen intrones; entre las pocas excepciones se encuentran los genes que codifican las histonas. La presencia de intrones en otros eucariotas es variable. Muchos genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* carecen de intrones, pero son más frecuentes en los genes de otras especies de levaduras. Los intrones también se encuentran en unos pocos genes de bacterias y arquebacterias. Los intrones del DNA son transcritos junto con el resto del gen por las RNA polimerasas. A continuación se cortan los intrones del transcrito primario de RNA y se empalman los exones para formar un RNA maduro y funcional. En los mRNA de eucariotas, la mayoría de los exones tienen menos de 1.000 nucleótidos de longitud y una gran parte se encuentra en el intervalo de 100 a 200 nucleótidos; codifican, por tanto, segmentos de 30 a 60 aminoácidos de longitud dentro de un polipéptido de mayor longitud. El tamaño de los intrones varía entre 50 y 700.000 nucleótidos, con una longitud mediana de 1.800. Los genes de los eucariotas superiores, incluidos los humanos, tienen generalmente mucho más DNA dedicado a los intrones que a los exones. Los aproximadamente 20.000 genes del genoma humano incluyen más de 200.000 intrones.

El RNA cataliza el corte y empalme de los intrones

Hay cuatro tipos de intrones. Los dos primeros, denominados intrones del grupo I y del grupo II, difieren en los detalles de sus mecanismos de corte y empalme, pero comparten una característica sorprendente: son de *autocorte y empalme* (*self-splicing*). No son necesarios enzimas proteicos. Los intrones del grupo I se encuentran en algunos genes nucleares, mitocondriales y de cloroplastos que codifican rRNA, mRNA y tRNA. Los intrones del grupo II se encuentran generalmente en los transcritos primarios de los mRNA de mitocondrias o cloroplastos, en hongos, algas y plantas. También se encuentran intrones del grupo I y del grupo II en los raros ejemplos de intrones bacterianos. Ninguno de los dos grupos necesita cofactores de alta energía (tales como el ATP) para el corte y empalme. En ambos grupos, los mecanismos de corte y empalme incluyen dos reacciones de transesterificación **(Fig. 26-13)**, en las que un grupo 2'- o 3'-hidroxilo de una ribosa realiza un ataque nucleofílico sobre un fósforo, formándose un nuevo enlace fosfodiéster a expensas del anterior mientras se mantiene el balance energético. Estas reacciones son muy parecidas a las reacciones de rotura y unión del DNA catalizadas por las topoisomerasas (véase la Fig. 24-19) y las recombinasas específicas de sitio (véase la Fig. 25-38).

La reacción de corte y empalme del grupo I requiere un nucleósido de guanina o un cofactor nucleotídico, pero el cofactor no se utiliza como fuente de energía,

sino que el grupo 3'-hidroxilo de la guanina se utiliza como nucleófilo en el primer paso de la ruta de corte y empalme. El grupo 3'-hidroxilo de la guanosina forma un enlace 3',5'-fosfodiéster normal con el extremo 5' del intrón **(Fig. 26-14)**. El 3'-hidroxilo del exón desplazado en este paso actúa seguidamente como nucleófilo en una reacción similar en el extremo 3' del intrón. El resultado es la escisión precisa del intrón y la ligación de los exones.

En los intrones del grupo II el patrón de reacción es similar excepto que el nucleófilo del primer paso es, en este caso, el grupo 2'-hidroxilo de un residuo de A situado *dentro* del intrón **(Fig. 26-15)**. Se produce un intermediario ramificado con una estructura en forma de lazo.

El autocorte y empalme de los intrones fue descubierto en 1982 en los estudios sobre el mecanismo de corte y empalme del intrón de grupo I del rRNA del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila*, llevados a cabo por Thomas Cech y colaboradores. Estos investigadores transcribieron in vitro DNA aislado de *Tetrahymena* (incluyendo el intrón) usando RNA polimerasa bacteriana purificada. El RNA resultante se cortaba y empalmaba a sí mismo con precisión sin la participación de ninguna proteína enzimática de *Tetrahymena*. El descubrimiento de que los RNA podían tener funciones catalíticas fue una importante contribución a la comprensión de los sistemas biológicos y un importante paso adelante en la comprensión de cómo la vida probablemente evoluciono.



Thomas Cech [Fuente: Foto de Glenn Asakawa/ University of Colorado.]

En eucariotas, la mayoría de intrones experimentan corte y empalme por el mismo mecanismo de formación de lazo de los intrones del grupo II . A pesar de eso, el corte y empalme de los intrones sucede en un gran complejo proteico llamado **espliceosoma,** y estos intrones, los **intrones de espliceosoma**, no se les asigna un numero de grupo. El espliceosoma está formado por complejos RNA-proteína especializados, denominados *p*equeñas *r*ibo*n*ucleo*p*roteínas nucleares (snRNP). Cada snRNP contiene un RNA de 100 a 200 nucleótidos de un tipo denominado **pequeños RNA nucleares (snRNA).** En los núcleos eucarióticos se encuentran generalmente cinco snRNA (U1, U2, U4, U5 y U6) en abundancia, implicados en las reacciones de corte y empalme. En levadura, varias snRNPs incluyen aproximadamente 100 proteinas diferentes, la mayoría de los cuales tienen homológos cercanos en otros organismos eucariotas. En humanos, estos componentes conservados de las proteínas consisten en más de 200 proteínas adicionales. Los espliceosomas se encuentran, de ste modo, entre las maquinas macromoleculares más complejas en cualquier célula eucariota. Los componentes del espliceosoma formados por RNA son los catalizadores de los diferentes pasos del mecanismo de corte y empalme. La complejidad general se puede considerar una nucleoproteína chaperona muy flexible que se puede adaptar a la gran diversidad en tamaño y en secuencia de los mRNA nucleares .

Los intrones de espliceosoma tienen generalmente la secuencia de dinucleótidos GU y AG en los extremos 5' y 3', respectivamente, que marcan el sitio de corte y empalme. El snRNA U1 contiene una secuencia complementaria de secuencias próximas al sitio 5' de corte y empalme de los intrones de los mRNA nucleares **(Fig. 26-16a)**, y el U1 de la snRNP se une a esta región del tránscrito primario. Una unidad U2 snRNP se une al extremo 3'. La adición de snRNP con U4,U5 y U6 condu-

Cory Stanton

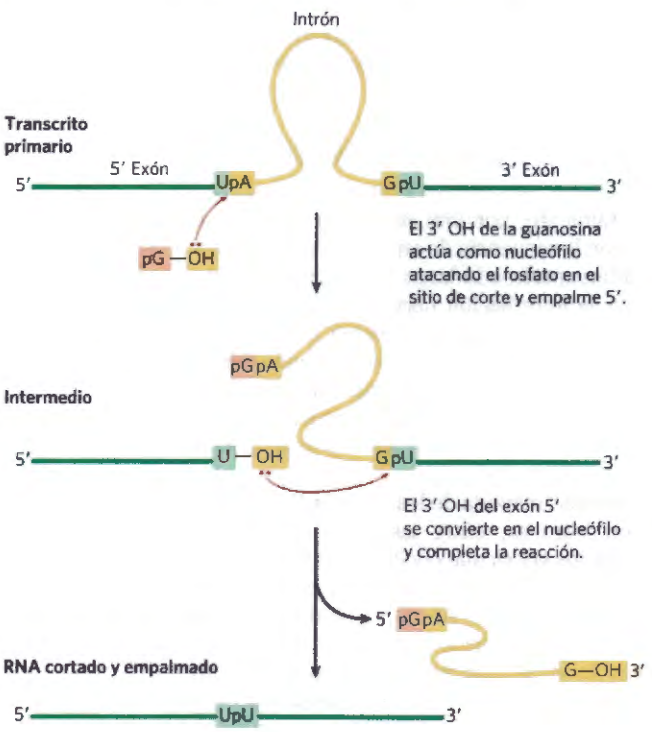


FIGURA 26-14 Mecanismo de corte y empalme de los intrones del grupo I. El nucleófilo del primer paso puede ser guanosina, GMP, GDP o GTP. El intrón escindido es finalmente degradado.

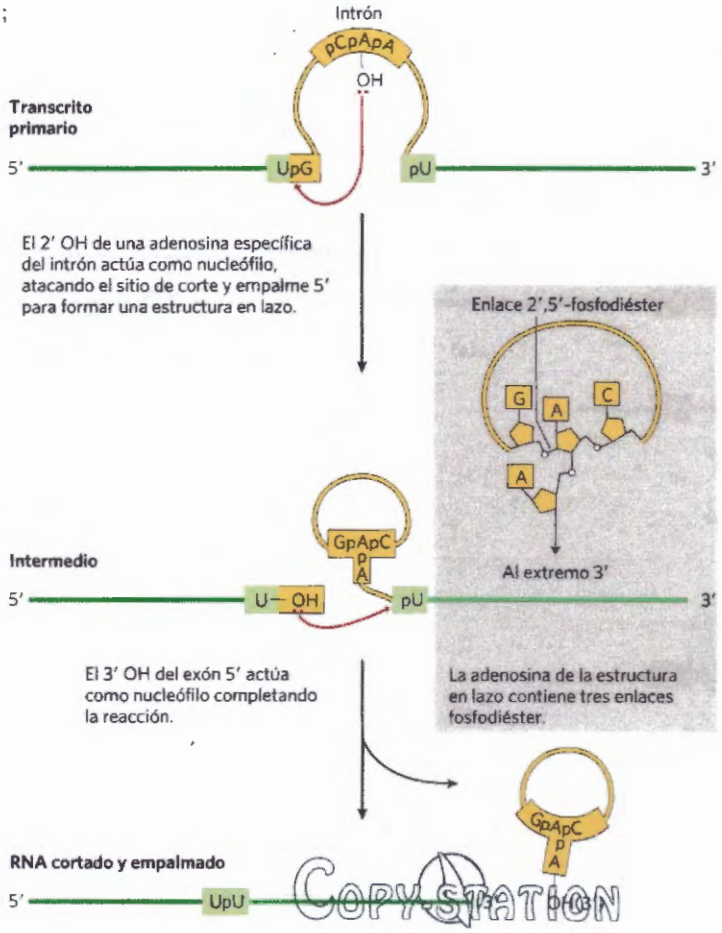


FIGURA 26-15 Mecanismo de corte y empalme de los intrones del grupo II. La química es similar a la del corte y empalme de los intrones del grupo I, excepto en la identidad del nucleófilo del primer paso y la formación de un intermedio tipo lazo en el que una rama es un enlace fosfodiéster 2',5'.

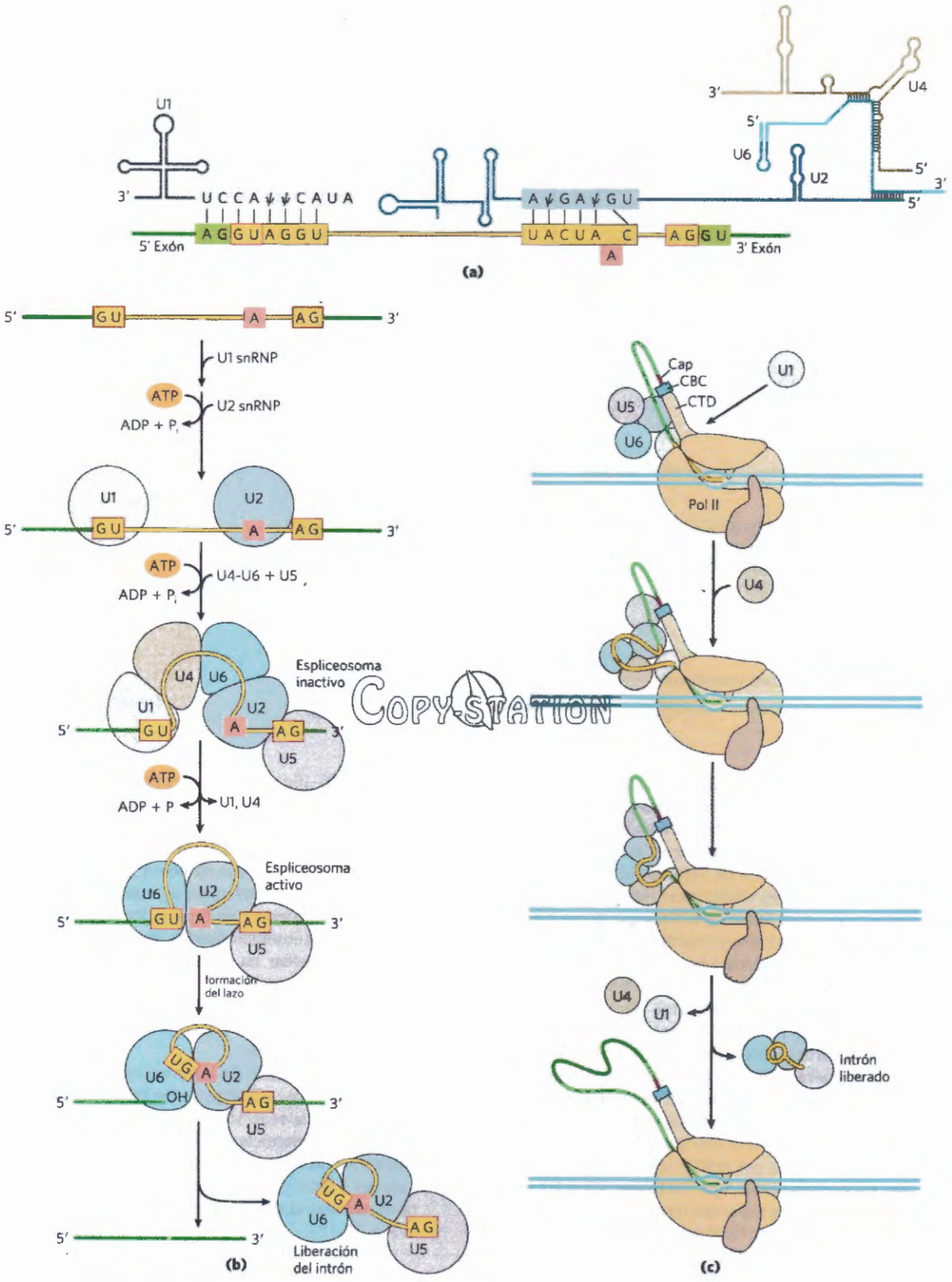
ce a la formación del espliceosoma (Fig. 26-16b). En un primer momento, se secuestran las partes claves del sitio activo en el mecanismo de corte y empalme en U6 a través de la hibridación con partes de U4 previniendo el corte no direccionado de enlaces fosfodiéster. Los snRNAs U4 y U6 deben encontrarse desenrollados y separados para exponer los sitios activos que se necesitan para el primer paso de corte y empalme. Todos los pasos en el proceso son reversibles. Las proteínas asociadas con los varios snRNPs tienen a veces multiples funciones de forma individual: el mecanismo de corte y empalme, transporte del mRNA al citoplasma, traducción, y la degradación del mRNA. Para la formación del espliceosoma se requiere ATP, pero no para las reacciones de corte y empalme. Algunos intrones de mRNA se cortan y empalman por un tipo menos común de complejo de corte y empalme, en el que las snRNP con U1 y con U2 son reemplazadas por snRNP con U11 y U12. Mientras que los espliceosomas que contienen U1 y U2 eliminan los intrones con secuencias terminales (5')GU y AG(3'), como se muestra en la Figura 26-16, los espliceosomas con U11 y U12 eliminan una clase rara de intrones que tienen secuencias terminales (5')AU y AC(3') para marcar los sitios de corte y empalme del intrón.

Algunos componentes de la maquinaria de corte y empalme se encuentran unidos a la CTD de la RNA polimerasa II; ello sugiere que la reacción de corte y empalme, al igual que otras reacciones de maduración del RNA, está finamente coordinada con la transcripción (Fig. 26-16c). Cuando se sintetiza el primer punto de corte se une un espliceosoma anclado. Acto seguido, el segundo punto de corte es capturado a su paso por el complejo, lo que facilita la yuxtaposición de los extremos del intrón y el subsiguiente proceso de corte y empalme. Después del corte y empalme, el intrón permanece en el núcleo y es finalmente degradado.

Los espliceosomas usados en el corte y empalme del mRNA nuclear ha evolucionado, con casi absoluta certeza, a partir de los intrones más antiguos del grupo II, por la contribución de la flexibilidad catalítica y de regulación de las snRNP relativa a la de sus ancestros de autocorte y empalme.

Una cuarta clase de intrones, que se encuentra en ciertos tRNA, se distingue de los intrones de los grupos I y II en que la reacción de corte y empalme requiere ATP y una endonucleasa. La endonucleasa de corte y empalme corta los enlaces fosfodiéster en ambos extremos del intrón y los dos exones se unen por un mecanismo similar al de la reacción de la DNA ligasa (véase la Fig. 25-16).

Aunque los intrones de espliceosoma están aparentemente limitados a los eucariotas, las otras tres clases de intrones no lo están. Se han encontrado genes con intrones del grupo I y del grupo II en las bacterias y en los virus bacterianos. El bacteriófago T4, por ejemplo, tiene varios genes que codifican proteínas con intrones del grupo I. Puede ser que los intrones sean más frecuentes en las arquea que en las bacterias.



COPY-STATION

FIGURA 26-16 Mecanismo de corte y empalme en los transcritos primarios de mRNA. (a) Interacciones de apareamiento de RNA en la formación de los complejos del espliceosoma. El snRNA U1 tiene una secuencia próxima de su extremo 5' complementaria del sitio de corte y empalme del extremo 5' del intrón. El apareamiento de bases de U1 a esta región del transcrito primario ayuda a definir el sitio de corte y empalme en 5' durante la formación del espliceosoma. (ψ representa la pseudouridina; véase la Fig. 26-22). U2 está apareado con el intrón en una posición que contiene el residuo A (de color rosa) que actúa de nucleófilo durante la reacción de corte y empalme. El apareamiento del snRNA U2 produce una protuberancia que desplaza y ayuda a activar el adenilato, cuyo 2' OH formará la estructura en lazo mediante un enlace 2',5'-fosfodiéster.

(b) Formación de los espliceosomas. Todos los pasos son reversibles pero se muestran de forma en hacia delante para simplificar. Primero se unen los snRNP U1 y U2, a continuación se unen los restantes snRNP (el complejo U4-U6 y U5) para formar un espliceosoma inactivo. Reordenamientos internos convierten esta especie en un espliceosoma activo, del que se han expulsado U1 y U4 y donde U6 está apareado simultáneamente con el sitio de corte en 5' y con U2. A continuación siguen las etapas catalíticas, similares a las de los intrones del grupo II (véase la Fig. 26-15). El espliceosoma activo esta ilustrado en la portada de este libro.

(c) La coordinación del corte y empalme y la transcripción une los dos sitios de corte y empalme. Véase el texto para más detallesTodos los pasos son reversibles. El espliceosoma duplica el tamaño de la RNA polimerasa II

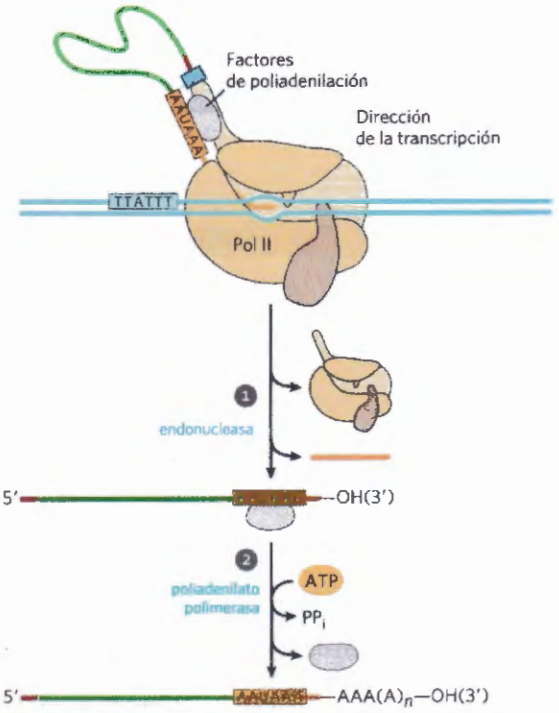


FIGURA 26-17 Adición de la cola de poli(A) al transcrito primario de RNA de los eucariotas. Pol II sintetiza RNA más allá del segmento del transcrito que contiene las secuencias señal para el corte, incluida la secuencia corriente arriba, altamente conservada, (5')AAUAAA. Esta secuencia señal para el corte se une a un complejo enzimático que incluye una endonucleasa, una poliadeniliato polimerasa y varias proteínas accesorias implicadas en el reconocimiento de secuencias, la estimulación del corte y la regulación de la longitud de la cola de poliA, todas ellas unidas al CTD. ❶ La endonucleasa corta el RNA en un punto que se encuentra de 10 a 30 nucleótidos en el lado 3' (más abajo) de la secuencia AAUAAA. ❷ La poliadenilato polimerasa sintetiza una cola de poli **(A)** de 80 a 250 nucleótidos, empezando en el sitio de corte.

Los mRNA eucarióticos tienen una estructura característica en el extremo 3'

La mayor parte de mRNA eucarióticos que se transcriben en el citoplasma tienen una cadena de residuos A de 30 residuos en levadura y de 50 hasta 100 en animales, que forman la **cola de poli(A)**. Esta cola sirve de sitio de unión de una o más proteínas específicas. La cola de poli(A) y sus proteínas asociadas tienen una variedad de papeles en la coordinación de la transcripción y la traducción, y probablemente ayudan a proteger al mRNA de la destrucción enzimática. Muchos RNA bacterianos también adquieren colas de poli(A), pero estas colas estimulan la degradación del mRNA en lugar de protegerlo.

La cola de poli(A) se añade mediante un proceso que consta de múltiples etapas. El transcrito se extiende más allá del sitio donde debe añadirse la cola de poli(A), a continuación es cortado en el sitio de adición del poli(A) por un componente endonucleasa de un gran complejo enzimático, también asociado a la CTD de la RNA polimerasa II **(Fig. 26-17)**. El sitio del mRNA en donde se produce el corte está indicado por dos secuencias: la secuencia (5')AAUAAA(3'), altamente conservada, situada de 10 a 30 nucleótidos en el lado 5' (corriente arriba) del sitio de corte y una secuencia peor definida, rica en residuos de G y U, situada de 20 a 40 nucleótidos corriente abajo del sitio de corte. El corte genera el grupo 3'-hidroxilo libre que caracteriza el extremo final del mRNA, al que se añaden inmediatamente los residuos de A por la **poliadenilato polimerasa**, que cataliza la reacción

$$\text{RNA} + n\text{ATP} \longrightarrow \text{RNA-(AMP)}_n + n\text{PP}_i$$

donde n = 80 a 250. Este enzima no requiere molde, pero necesita el mRNA cortado como cebador. Estas colas poli(A) más largas se añaden en el núcleo, y son significativamente acortadas después de que el mRNA sea transportado al núcleo.

La **Figura 26-18** resume el proceso global de maduración de un mRNA eucariótico típico. En algunos casos también se modifica la región del mRNA que codifica el polipéptido mediante un proceso de "edición" (véanse los detalles en la Sección 27.1). La edición comprende procesos que añaden o eliminan bases en las regiones codificantes de los transcritos primarios o que cambian la secuencia (por ejemplo, la desaminación enzimática de un residuo de C para dar un residuo de U). Un ejemplo muy notable ocurre en los protistas parásitos conocidos como tripanosomas: se sintetizan grandes fragmentos de un mRNA sin uridilato, se añaden posteriormente los residuos U durante la edición.

La maduración diferencial del RNA puede dar lugar a múltiples productos a partir de un gen

Una de las paradojas de la genómica moderna consiste en que la complejidad aparente de los organismos no guarda relación con el número de genes que codifican proteínas o incluso con la cantidad de DNA genómico. Algunos transcritos eucariotas pueden madurar de más de una manera para producir *diferentes* mRNAs y en

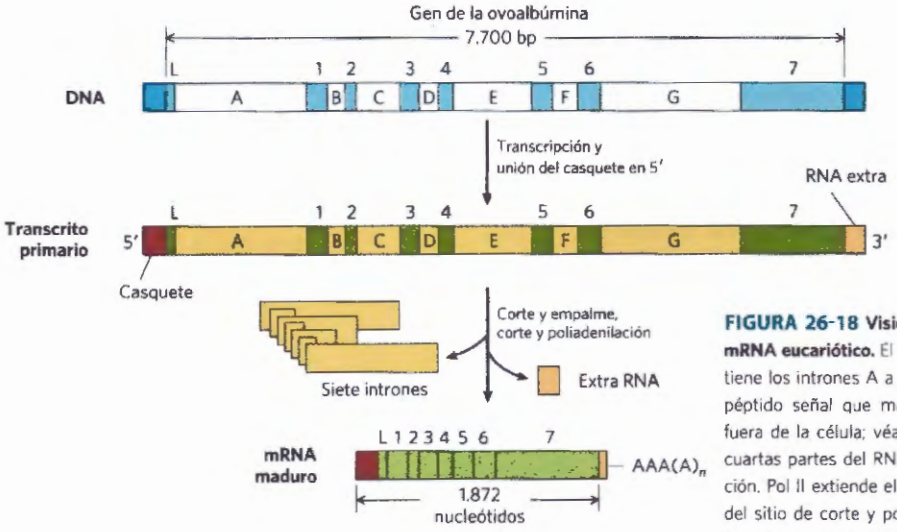
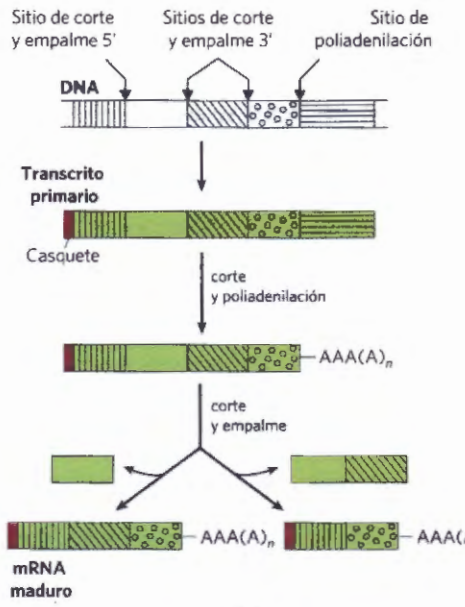


FIGURA 26-18 Visión general de la modificación de un mRNA eucariótico. El gen de la ovoalbúmina aquí mostrado tiene los intrones A a G, los exones 1 a 7 y L (L codifica un péptido señal que marca la proteína para la exportación fuera de la célula; véase la Fig. 27-40). Alrededor de tres cuartas partes del RNA son eliminadas durante la maduración. Pol II extiende el transcrito primario bastante más allá del sitio de corte y poliadenilación ("RNA extra") antes de terminar la transcripción. Las señales de terminación de la Pol II aún no han sido determinadas.

consecuencia diferentes polipéptidos. La mayoría de la variación en el procesamiento de los transcritos es el resultado del **corte y empalme alternativo**, en el qual un exón en particular puede ser o no incluido en el mRNA maduro. El mecanismo de corte y empalme alternativo ocurre en un numero pequeño de genes en levadura, pero en más de un 95% de los genes humanos.

La **figura 26-19a** ilustra como los patrones de corte y empalme alternativo pueden producir más de una proteína del que originalmente era un mismo transcrito primario. El transcrito primario contiene señales moleculares para todas las vías de maduración alternativa, mientras que los factores de maduración y proteínas de unión al RNA determinan la via predominante dependiendo de la situación metabólica de la célula. Por ejem-

Copy-STATION



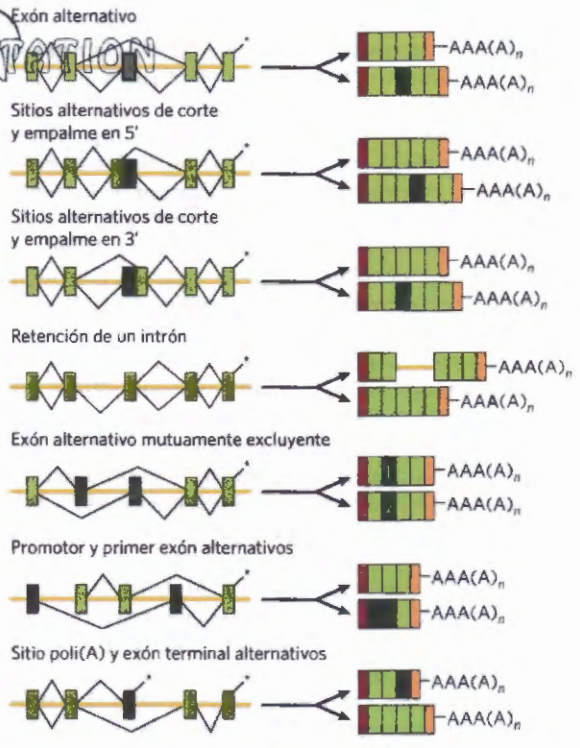


FIGURA 26-19 Dos mecanismos para la maduración alternativa de transcritos complejos en los eucariotas. (a) Patrones de corte y empalme alternativos. Se muestran dos sitios diferentes de corte en 3'. En los dos mecanismos se forman diferentes mRNA maduros a partir del mismo transcrito primario. **(b)** Resumen de los patrones de corte y empalme. Los exones se muestran en verde sombreado, los intrones y las las regiones no traducidas como líneas amarillas. Se marcan con un asterisco las posiciones en las que la cola poli-A tiene que ser añadida. Los exones unidos siguiendo un patrón de corte y empalme particular se unen con líneas negras. Para cada transcrito, los patrones alternativos que se muestran arriba y abajo del transcrito generan los mRNA maduros situados en la parte superior e inferior respectivamente. En los productos, los casquette 5' se representan por cajas rojas y las regiones no traducidas por cajas naranjas. [Fuente: **(b)** Información de B.J. Blencowe, *Cell* 126:37, 2006, Fig 2.]

plo, la composición proteica de snRNPs en el espliceosoma puede variar en la maduración de diferentes genes, y hasta canviar suficiente como para que la maduración de un gen en particular sea alterada en diferentes etapas del desarrollo animal. Como ejemplo, el mecanismo de corte y empalme alternativo produce tres formas diferentes de la cadena pesada de la miosina durante el desarrollo de la mosca de la fruta. Hay otros muchos patrones de corte y empalme alternativo (Fig. 26-19b).

Los transcritos complejos también pueden tener más de un sitio de poliadenilación. Si hay dos o más sitios de corte y poliadenilación, la utilización del más próximo al extremo 5' elimina un fragmento mayor de la secuencia del transcrito primario **(Fig. 26-20)**. Este mecanismo denominado elección del sitio de adición del poli(A) genera diversidad en los dominios variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (véase la Fig. 25-43).

Ambos mecanismos, el corte y empalme alternativo y la elección del sitio de adición del poli(A) participan en la maduración de multiples genes. Por ejemplo, un único transcrito es procesado usando ambos mecanismos para producir dos hormonas diferentes en la rata: la hormona reguladora del calcio, calcitonina, en el tiroides y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el cerebro **(Fig. 26-21)**. Conjuntamente, los mecanismos de corte y empalme alternativo y la elección del sitio de adición poli(A) incrementan enormemente el numero de diferentes proteínas generadas a partir de los genomas de los eucariotas superiores.

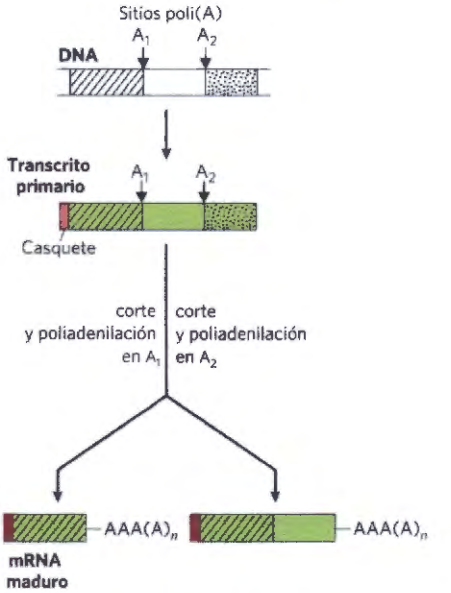


FIGURA 26-20 Elección del sitio de adición del poli(A). Se muestran dos sitios alternativos de corte y adición del poli(A), A1 y A2

Los RNA ribosómicos y los tRNA también son modificados

La maduración post-transcripcional no se limita al mRNA. Los RNA ribosómicos, tanto de células bacterianas, arqueas o de células eucarióticas, se forman a partir de precursores más largos, denominados **RNA prerribosómicos,** o pre-rRNA. Los RNA de transferencia proceden igualmente de precursores más largos. Estos RNA también pueden contener diversos nucleósidos modificados; en la **Figura 26-22** se muestran algunos ejemplos.

RNA ribosómicos En las bacterias, los rRNA 16S, 23S y 5S (y algunos tRNA, aunque la mayoría de de los tRNA están codificados en otros lugares) proceden de un único precursor 30S de alrededor de 6.500 nucleótidos.

COPYSTATION

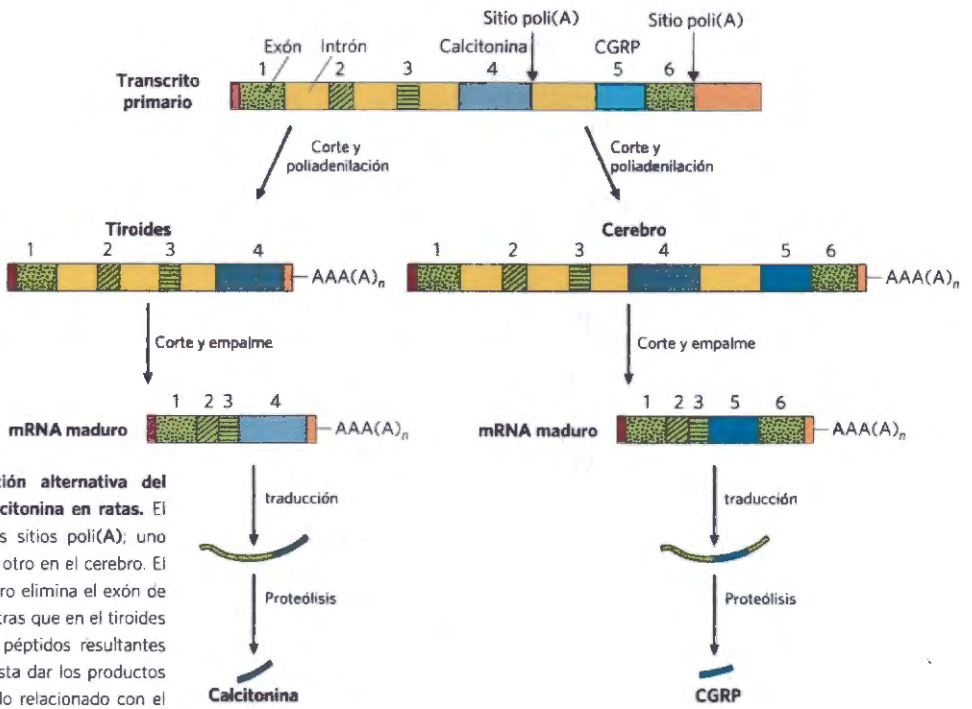


FIGURA 26-21 Maduración alternativa del transcrito del gen de la calcitonina en ratas. El transcrito primario tiene dos sitios poli(A), uno predomina en el tiroides y el otro en el cerebro. El corte y empalme en el cerebro elimina el exón de la calcitonina (exón 4), mientras que en el tiroides este exón se conserva. Los péptidos resultantes continúan su maduración hasta dar los productos hormonales finales: el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el cerebro y la calcitonina en el tiroides.

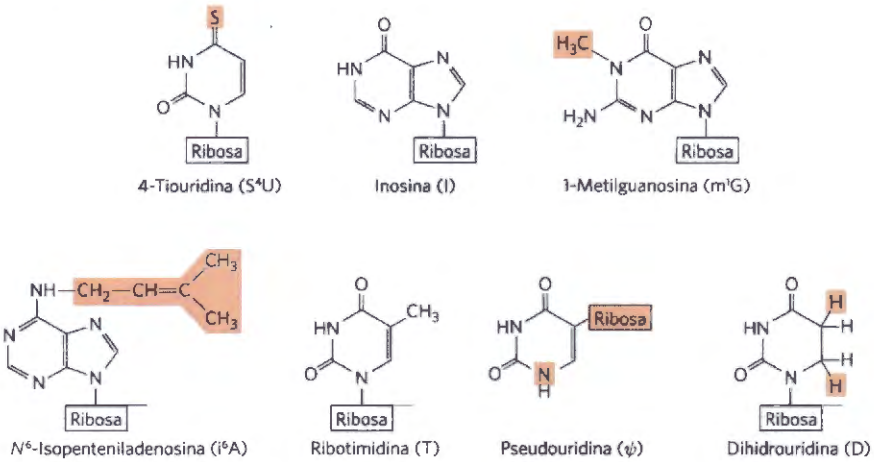


FIGURA 26-22 Algunas de las bases modificadas de los rRNA y tRNA, producidas en reacciones postranscripción. Observe el punto de unión inusual de la ribosa en la pseudouridina. Los símbolos estándar se muestran entre paréntesis. Esta es una pequeña muestra de los 96 nucleósidos modificados presentes en diferentes especies de RNA, con 81 tipos diferentes en los tRNA y 30 en los rRNA observados hasta la fecha. Puede encontrarse una lista completa de estas bases modificadas en el banco de datos de modificaciones del RNA (http://modomics.genesilico.pl)

Durante la maduración se elimina RNA en ambos extremos del precursor 30S y segmentos entre los rRNA **(Fig. 26-23)**. Los rRNA 16S y 23S contienen nucleósidos modificados. En *E. coli*, el rRNA 16S contiene 11 modificaciones que son una pseudouridina y diez nucleósidos metilados en la base o en el grupo 2'-hidroxilo o en ambos. El rRNA 23S tiene 10 pseudouridinas, 1 dihidrouridina y 12 nucleósidos metilados. En las bacterias, cada modificación está catalizada generalmente por un enzima distinto. Las reacciones de metilación usan *S*-adenosilmetionina como cofactor. No se necesita ningún cofactor para la formación de pseudouridina.

El genoma de *E. coli* codifica siete moléculas de pre-RNA. Todos estos genes tienen las regiones codificantes de RNA esencialmente idénticas, pero difieren en los segmentos entre los genes. El segmento entre los genes de rRNA 16S y 23S codifica generalmente uno o dos tRNA, originándose diferentes tRNA de los diferentes transcritos de pre-rRNA. También se encuentran secuencias codificantes de tRNA en el lado 3' del rRNA 5S en algunos transcritos precursores.

En los eucariotas la situación es más compleja. Un transcrito de pre-rRNA de 45S es sintetizado por la RNA polimerasa I y modificado en el nucleolo para dar los rRNA 18S, 28S y 5,8S, característicos de los ribosomas eucarióticos **(Fig. 26-24)**. Como en las bacterias, la maduración consiste en reacciones de corte por endo o exorribonucleasas y reacciones de modificación de nucleósidos. Algunos pre-rRNA también incluyen intrones que se han de cortar y empalmar. Todo el proceso comienza en el nucleolo, en grandes complejos que se forman sobre el precursor de rRNA a medida que es sintetizado por la Pol I. La transcripción del rRNA, la maduración del rRNA y la formación de los ribosomas en el nucleolo están perfectamente coordinados. Cada complejo contiene las ribonucleasas que cortan el precursor de rRNA, los enzimas que modifican determinadas bases, numerosos **pequeños RNA nucleolares**, o **snoRNA**, que guían las modificaciones de los nucleósi-

Copy Station

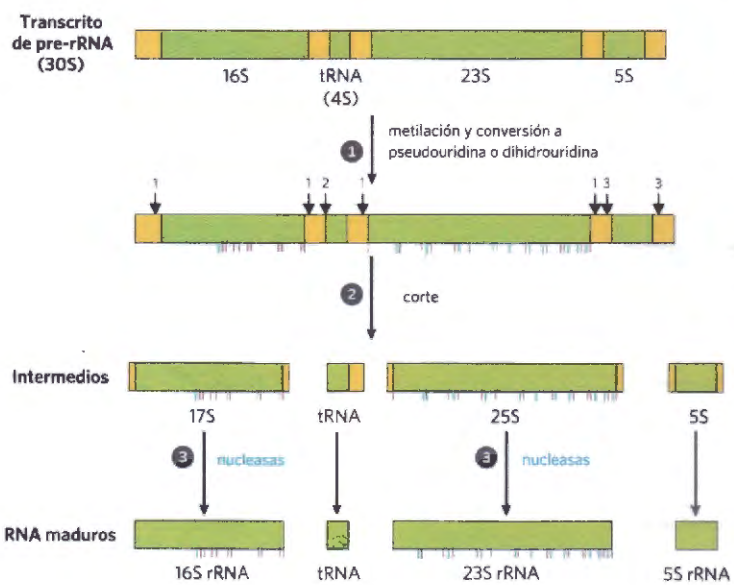


FIGURA 26-23 Maduración de transcritos de pre-rRNA en las bacterias. ❶ Antes del corte, el precursor de RNA 30S es metilado en bases específicas (marcas rojas finas) y algunos residuos de uridina se convierten en pseudouridina (marcas azules finas) o dihidrouridina (marcas negras finas). Las reacciones de metilación son de múltiples tipos, algunas ocurren en las bases y otras en los grupos 2'-hidroxilo. ❷ El corte libera precursores de los rRNA y tRNA. Los enzimas RNasa III, RNasa P y RNasa E llevan a cabo el corte en los puntos marcados 1, 2 y 3, respectivamente. Tal como se describe en el texto, la RNasa P es un ribozima. ❸ Los rRNA finales, 16S, 23S y 5S, son el resultado de la acción de una variedad de nucleasas específicas. Las siete copias del gen del pre-rRNA en el cromosoma de *E. coli* difieren en número, localización e identidad de los tRNA incluidos en el transcrito primario. Algunas copias del gen tienen segmentos génicos de tRNA adicionales entre los segmentos de rRNA 16S y 23S y en el extremo 3' más alejado del transcrito primario.

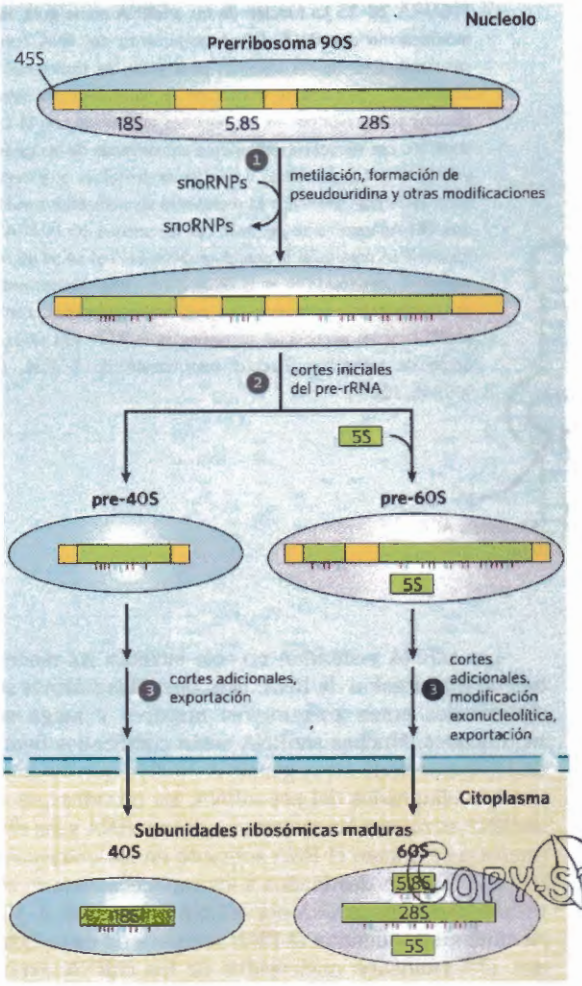


FIGURA 26-24 Maduración de los transcritos de pre-rRNA en vertebrados. Durante la transcripción, el transcrito primario 45S se incorpora a un complejo prerribosómico 90S nucleolar, en el que la maduración del rRNA y la formación del ribosoma están estrechamente acoplados. ❶ El precursor 45S se metila en más de 100 de sus 14.000 nucleótidos, ya sea en las bases o en los grupos 2'-OH (trazos rojos), algunas uridinas se convierten en pseudouridina (trazos azules), y también se producen unas pocas modificaciones de otro tipo (los trazos verdes indican la dihidrouridina). ❷ y ❸ Una serie de cortes enzimáticos del precursor 45S producen los rRNA 18S, 5,8S y 28S y las subunidades ribosómicas gradualmente toman forma con la incorporación de proteínas ribosómicas. Las reacciones de corte y todas las modificaciones requieren RNA nucleolares pequeños (snoRNA), que forman parte de complejos proteicos (snoRNP) en el nucleolo que recuerdan los espliceosomas. El rRNA 5S se produce independientemente.

dos y algunas reacciones de corte y proteínas ribosómicas. En levadura, el conjunto del proceso comprende el pre-RNA, más de 170 proteínas no ribosómicas, snoRNA para cada una de las modificaciones de nucleótidos (unas 70 en total, pues algunos snoRNA guían dos tipos de modificación) y las 78 proteínas ribosómicas. Los humanos tienen un número incluso mayor de nucleósidos modificados, unos 200, y un mayor número de snoRNA asociados. La composición de los complejos puede variar a medida que se forman los ribosomas, y muchos de los complejos intermedios pueden rivalizar en complejidad con los propios ribosomas y snRNP. El rRNA 5S de la mayoría de eucariotas se sintetiza como un transcrito totalmente independiente por una polimerasa diferente (Pol III).

Las modificaciones más comunes de los nucleósidos en los rRNA eucarióticos son, de nuevo, la conversión de la uridina en pseudouridina, la metilación de los nucleósidos dependiente de adoMet (a menudo en los grupos 2'-hidroxilo). Estas reacciones son realizadas por complejos de proteínas y snoRNA, o **snoRNP**, formados por un snoRNA y cuatro o cinco proteínas, entre las que se encuentra el enzima que lleva a cabo la modificación. Hay dos clases de snoRNP, ambas definidas por elementos clave de secuencia conservada, representados por secuencias simbolizadas por letras. La secuencia H/ACA de las snoRNP participa en la pseudouridilación, y la secuencia C/D de las snoRNP en las 2'-*O*-metilaciones. A diferencia de las bacterias, el mismo enzima puede participar en la modificación de muchos sitios, guiado por los snoRNA.

Los snoRNA tienen de 60 a 300 nucleótidos de longitud. Muchos están codificados dentro de los intrones de otros genes y se cotranscriben con estos genes. Cada snoRNA contiene una secuencia de 10 a 21 nucleótidos perfectamente complementaria de algún sitio de un rRNA. Los elementos de secuencia conservados en el resto del snoRNA se pliegan en estructuras a las que se unen las proteínas de las snoRNP **(Fig. 26-25)**.

RNA de transferencia La mayoría de células tienen entre 40 y 50 tRNA diferentes y en las células eucarióticas hay múltiples copias de muchos de los genes de tRNA. Los RNA de transferencia proceden de RNA precursores más largos por eliminación enzimática de nucleótidos de los extremos 5' y 3' **(Fig. 26-26)**. En los transcritos de tRNA de los eucariotas, ocasionalmente se encuentran intrones que deben ser eliminados. Cuando dos o más tRNA diferentes se encuentran en el mismo trascrito primario, se separan por corte enzimático. La endonucleasa RNasa P, presente en todos los organismos, elimina RNA del extremo 5' de los tRNA. El enzima contiene proteína y RNA. El componente de RNA es esencial para la actividad y en las células bacterianas puede realizar su función con precisión aún en ausencia del componente proteico. La RNasa P es, por tanto, otro ejemplo de RNA catalítico, como se describe con mayor detalle más adelante. El extremo 3' de los tRNA se modifica mediante una o más nucleasas, entre las que se encuentra la exonucleasa RNasa D.

Los precursores del RNA de transferencia pueden experimentar aún más modificaciones postranscripcionales. El trinucleótido 3'-terminal CCA(3'), al cual se unirá un aminoácido en la síntesis proteica (Capítulo 27), ausente en algunos precursores de tRNA bacterianos y en todos los precursores de tRNA eucarióticos es añadido durante la maduración (Fig. 26-26). La adición corre a cargo de la tRNA nucleotidiltransferasa, enzima peculiar que une los tres ribonucleosido trifosfato precursores en sitios activos separados y cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster para producir la secuencia CCA(3'). La creación de esta secuencia definida de nucleótidos es, por tanto, independiente de la presencia de un molde de DNA o de RNA ya que el molde es el sitio de unión del enzima.

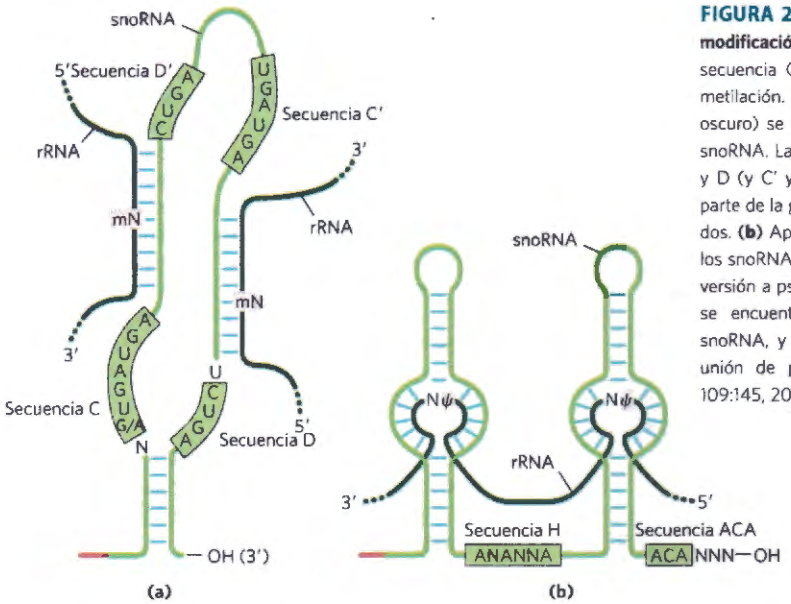


FIGURA 26-25 La función de los snoRNA como guía en la modificación del rRNA. (a) Apareamiento del RNA con la secuencia C/D de los snoRNA para guiar las reacciones de metilación. Los sitios de metilación en el rRNA diana (verde oscuro) se encuentran en las regiones apareadas con el C/D snoRNA. Las secuencias altamente conservadas de las cajas C y D (y C' y D') son sitios de unión de proteínas que forman parte de la gran snoRNP. nM representa los nucleótidos metilados. **(b)** Apareamiento del RNA con las secuencias H/ACA de los snoRNA para guiar la pseudouridilación. Los sitios de conversión a pseudouridina en el rRNA diana (fragmentos verdes) se encuentran, de nuevo, en regiones apareadas con el snoRNA, y las secuencias conservadas H/ACA son sitios de unión de proteínas. [Fuente: Información de T. Kiss, *Cell* 109:145, 2002.]

La etapa final de la maduración del tRNA consiste en la modificación de algunas bases por metilación, desaminación o reducción (Fig. 26-22). En el caso de la pseudouridina, la base (uracilo) se separa y se vuelve a unir al azúcar en C-5. Algunas de estas bases modificadas se encuentran en posiciones características en todos los tRNA (Fig. 26-26).

Los RNA de función especializada experimentan varios tipos de maduración

El número de clases conocidas de RNA de función especializada aumenta rápidamente así como la variedad de funciones que se han identificado. Muchos de estos RNA experimentan maduración

Los snRNA y snoRNA no sólo facilitan las reacciones de maduración de RNA, sino que ellos mismos son sintetizados como precursores mayores y luego son modificados. Muchos snoRNA están codificados dentro de los intrones de otros genes. A medida que los intrones son eliminados del pre-mRNA, las proteínas de los snoRNP se unen a las secuencias del snoRNA y las ribonucleasas eliminan el RNA sobrante en los extremos 5' y 3'. Los snRNA destinados a los espliceosomas se sintetizan como pre-snRNA por la RNA polimerasa II, y las ribonucleasas eliminan el RNA sobrante de cada extremo. Determinados nucleósidos de los snRNA experimentan también 11 tipos de modificación, con predominio de la metilación en 2'-*O* y la conversión de uridina en pseudouridina.

COPYSTATION

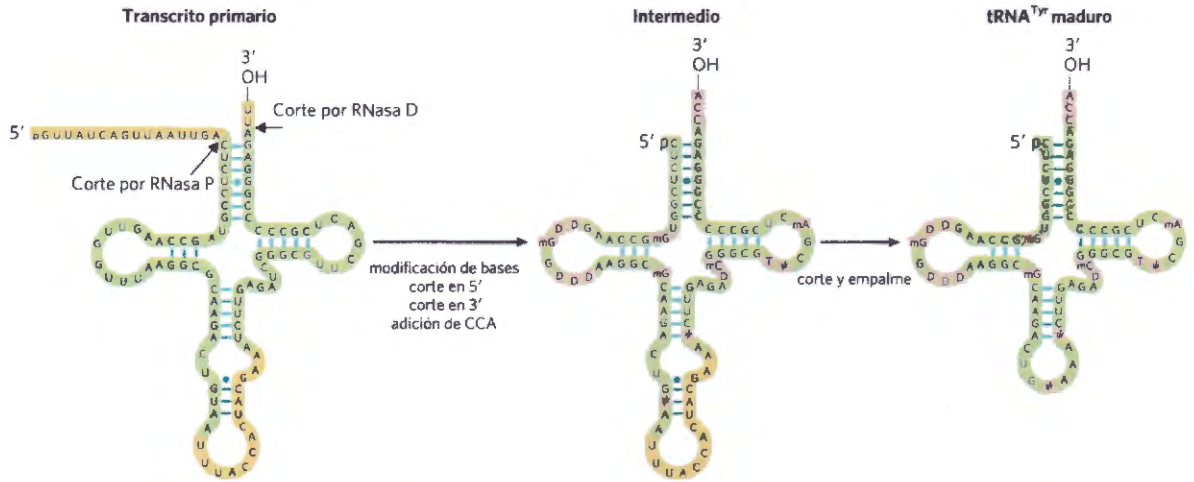


FIGURA 26-26 Maduración de los tRNA en bacterias y eucariotas. El $tRNA^{Tyr}$ (el tRNA específico para la unión de la tirosina; véase el Capítulo 27) de levadura se toma como ejemplo para ilustrar los pasos importantes. Las líneas azules cortas representan apareamiento de bases normal; los puntos azules indican pares de base G-U. Las secuencias de nucleótidos mostradas en amarillo se eliminan del transcrito primario. En primer lugar se modifican los extremos, el 5' primero y el 3' después. A continuación se añade CCA al extremo 3', un paso necesario en la maduración de los tRNA eucarióticos, así como en los tRNA bacterianos que carecen de esta secuencia en el transcrito primario. Al tiempo que se modifican los extremos, también se modifican bases específicas del resto del transcrito (véase la Fig. 26-22). La etapa final para el tRNA eucariótico aquí mostrado consiste en el corte y empalme del intrón de 14 nucleótidos. Los intrones se encuentran en algunos tRNA eucarióticos, pero no en los bacterianos.

Los **micro RNA (miRNA)** son una clase especial de RNA que interviene en la expresión génica. Son RNA no codificantes, de unos 22 nucleótidos de longitud, conplementarios de la secuencia de regiones determinadas de los mRNA. Se encuentran en plantas y en animales, desde gusanos hasta mamíferos, promueven la degradación los mRNA y suprimen su traducción. Aproximadamente unos 1.500 genes humanos codifican para miRNA, y uno o más de estos miRNA afecta la expresión de la mayoría de genes codificantes.

Los miRNA se sintetizan a partir de precursores mucho mayores en varias etapas **(Fig. 26-27)**. Los transcritos primarios de los miRNA (pri-miRNA) varían mucho en tamaño, algunos están codificados por los intrones de otros genes y se coexpresan con estos genes huésped. Sus funciones en la regulación génica también se detallan en el Capítulo 28.

Algunas etapas del metabolismo del RNA están catalizadas por enzimas de RNA

El estudio de la maduración postranscripción de las moléculas de RNA llevó a uno de los descubrimientos más importantes de la bioquímica moderna: la existencia de enzimas de RNA. Los ribozimas mejor caracterizados son los intrones de autocorte y empalme del grupo I, la RNasa P y el ribozima en cabeza de martillo (descrito más adelante). La mayoría de las actividades de estos ribozimas se basan en dos reacciones fundamentales: la transesterificación (Fig. 26-13) y la hidrólisis del enlace fosfodiéster (corte). El sustrato de los ribozimas es con frecuencia una molécula de RNA, que incluso puede ser parte del propio ribozima. Con un sustrato de RNA, un catalizador de RNA puede aprovechar las interacciones de apareamiento de bases para alinear el sustrato para la reacción.

Los ribozimas tienen tamaños muy variables. Un intrón de autocorte y empalme del grupo I puede tener más de 400 nucleótidos. El ribozima en cabeza de martillo consiste en dos cadenas de RNA con un total de sólo 41 nucleótidos **(Fig. 26-28)**. Como sucede con los enzimas proteicos, la estructura tridimensional de los ribozimas es importante para la función. Los ribozimas se inactivan cuando se calientan por encima de su temperatura de fusión, al añadir agentes desnaturalizantes o al añadir oligonucleótidos complementarios, que destruyen los patrones normales de apareamiento de bases. Los ribozimas también pueden inactivarse mediante la sustitución de nucleótidos esenciales. La **Figura 26-29**

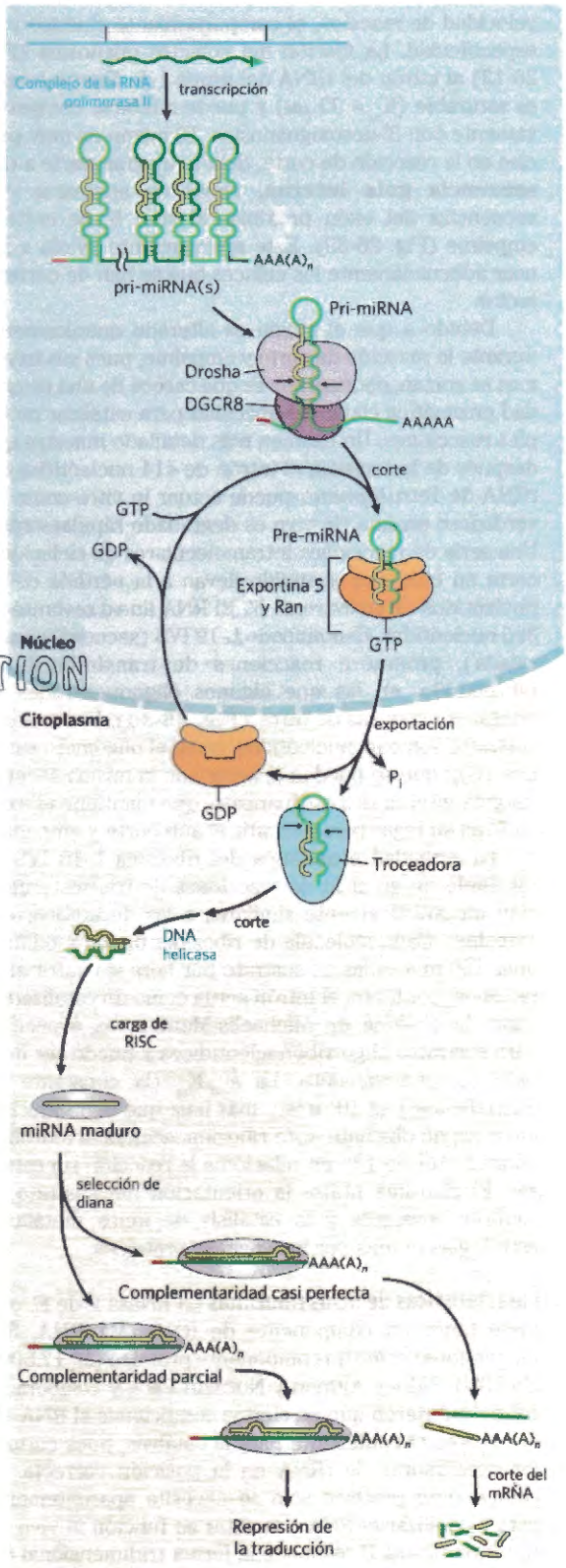


FIGURA 26-27 Síntesis y maduración de los miRNA. El transcrito primario de los miRNA es un RNA mayor de longitud variable, un pri-miRNA. Su maduración corre a cargo, en gran parte, de dos endorribonucleasas de la familia de la RNasa III, Drosha y Dicer. En primer lugar, en el núcleo, se reduce el pri-miRNA hasta un precursor precursor miRNA de 70 a 80 nucleótidos (pre-miRNA) por un complejo proteico que contiene Drosha y otra proteína, DGCR8. El pre-miRNA se exporta a continuación al citoplasma, formando un complejo con una proteína denominada exportina-5 y con la GTPasa Ran (véase la Fig. 27-42). En el citoplasma, Ran hidroliza el GTP y, a continuación, se liberan la proteína exportina-5 y el pre-miRNA. Las proteínas Ran-GDP y exportina-5 vuelven al núcleo. El pre-miRNA es modificado por Dicer para producir un miRNA casi maduro apareado con un corto RNA complementario. El RNA complementario se elimina mediante una RNA helicasa y el miRNA maduro se incorpora a complejos proteicos, tales como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que, a continuación, se unen a un mRNA diana. Si la complementaridad entre el miRNA y su diana es casi perfecta, el mRNA diana es cortado. Si la complementaridad es sólo parcial el complejo bloquea la traducción del mRNA diana. [Fuente: Información de E. Wienholds y R.H.A. Plasterk, FEBS Lett. 579:5911, 2005; V. N. Kim et al., Nature Rev. Mol. Cell Bio. 10:126, 2009, Figuras 2-4]

Copystation

muestra en detalle la estructura secundaria de un intrón de autocorte y empalme del grupo I del precursor del rRNA 26S de *Tetrahymena*.

Propiedades enzimáticas de los intrones del grupo I Los intrones de autocorte y empalme del grupo I comparten varias propiedades con los enzimas, entre las que se encuentran, además de acelerar considerablemente la velocidad de reacción, el comportamiento cinético y su especificidad. La fijación del cofactor guanosina (Fig. 26-13) al intrón del rRNA del grupo I de *Tetrahymena* es saturable ($K_m \approx 30\ \mu M$) y puede inhibirse competitivamente con 3'-desoxiguanosina. El intrón es muy preciso en la reacción de corte, debido en gran parte a una **secuencia guía interna,** capaz de aparearse con secuencias del exón próximas al sitio 5' de corte y empalme (Fig. 26-39). Este apareamiento ayuda a alinear adecuadamente los enlaces que se han de cortar y juntar.

Debido a que el intrón es alterado químicamente durante la reacción de corte y empalme, pues sus extremos se cortan, podría parecer que carece de una propiedad enzimática clave: la capacidad para catalizar múltiples reacciones. Un examen más detallado muestra que después de la escisión, el intrón de 414 nucleótidos del rRNA de *Tetrahymena* puede actuar in vitro como un verdadero enzima (in vivo es degradado rápidamente). Una serie de reacciones intramoleculares de ciclación y corte en el intrón escindido llevan a la pérdida de 19 nucleótidos de su extremo 5'. El RNA lineal restante de 395 nucleótidos, denominado L-19 IVS (secuencia intercalada), promueve reacciones de transferencia de nucleotidilo, en las que algunos oligonucleótidos se alargan a expensas de otros **(Fig. 26-30)**. Los mejores sustratos son oligonucleótidos, como el oligómero sintético $(C)_5$, que se puedan aparear con la misma secuencia guía interna rica en guanilato, que mantiene el exón en 5' en su lugar para permitir el autocorte y empalme.

La actividad enzimática del ribozima L-19 IVS es resultado de un ciclo de reacciones de transesterificación mecanísticamente similares a las de autocorte y empalme. Cada molécula de ribozima puede modificar unas 100 moléculas de sustrato por hora sin sufrir alteraciones; por tanto, el intrón actúa como un catalizador. Sigue la cinética de Michaelis-Menten, es específico para sustratos oligorribonucleotídicos y puede ser inhibido competitivamente. La k_{cat}/K_m (la constante de especificidad) es $10^3\ M^{-1}s^{-1}$, más baja que la de muchos enzimas; no obstante, este ribozima acelera la hidrólisis en un factor de 10^{10} en relación a la reacción sin catalizar. El ribozima utiliza la orientación del sustrato, la catálisis covalente y la catálisis de iones metálicos, estrategias usadas por los enzimas proteicos.

Características de otros ribozimas La RNasa P de *E. coli* tiene tanto un componente de RNA (M1 RNA, 377 nucleótidos) como un componente proteico (M_r 17.500). En 1983, Sidney Altman y Norman Pace y colaboradores descubrieron que en ciertas condiciones el RNA M1 por sí solo era suficiente para la catálisis, pues cortaba los precursores de tRNA en la posición correcta. El componente proteico sólo se necesita aparentemente para estabilizar el RNA o facilitar su función in vivo. El ribozima RNasa P reconoce la forma tridimensional del

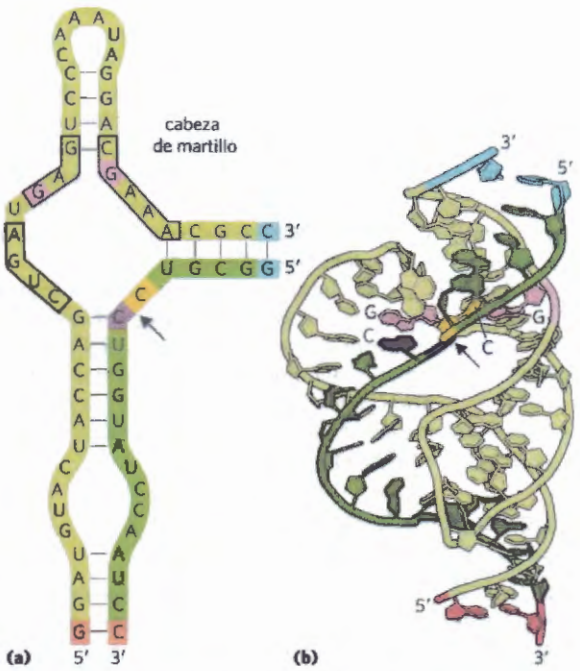


FIGURA 26-28 Ribozima en cabeza de martillo. Ciertas entidades de tipo vírico denominadas virusoides tienen pequeños genomas de RNA y generalmente necesitan de otro virus que asista su replicación , su empaquetamiento o ambos. Algunos RNA de virusoides contienen pequeños segmentos que promueven reacciones de corte en sitios específicos de RNA que están asociadas con la replicación. Estos segmentos se denominan ribozimas en cabeza de martillo porque sus estructuras secundarias tienen forma de cabeza de martillo. Los ribozimas en cabeza de martillo se han definido y estudiado separadamente de los RNA víricos que son mucho mayores. **(a)** Secuencias mínimas requeridas para la catálisis por el ribozima. Los nucleótidos encuadrados están muy conservados y son necesarios para la función catalítica. Los nucleótidos de guanina, sombreados en rosa forman parte del centro activo. La flecha indica el sitio de autocorte. **(b)** Estructura tridimensional (véase la Fig. 8-25b para una vista espacial). Las cadenas están coloreadas como en **(a)**. El ribozima en cabeza de martillo es un metaloenzima; los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad in vivo. El enlace fosfodiéster en el sitio de autocorte está indicado con una flecha. [Fuente: **(b)** PDB ID 3ZD5, M. Martick and W. G. Scott, *Cell* 126:309, 2006]

COPY-STATION

sustrato de pre-tRNA junto con la secuencia CCA y así puede cortar los extremos 5' de diversos tRNA (Fig. 26-26).

El número de ribozimas conocidos continúa expandiéndose. Algunos virusoides, pequeños RNA asociados con virus vegetales forman una estructura que promueve una reacción de autocorte. El ribozima en cabeza de martillo, ilustrada en la Fig. 26-28 está en esta clase, cataliza la hidrólisis de un enlace fosfodiéster interno. Se conocen al menos nueve clases de estructuras de ribozimas que promueven el autocorte; todas usan la catálisis general de acido y base (Fig. 6-8) para promover el ataque de un grupo 2'-hydroxil a un enlace fosfodiéster contiguo. La reacción de corte y empalme en el espliceosoma tiene lugar en un centro catalítico formado por los snRNA, U2, U5 y U6 (Fig.26-16). Y, tal y como se puede ver en el Capítulo 27, un componente de RNA del ribosoma cataliza la síntesis de las proteínas.

El estudio del RNA catalítico ha permitido entender con mayor profundidad la catálisis en general y tiene

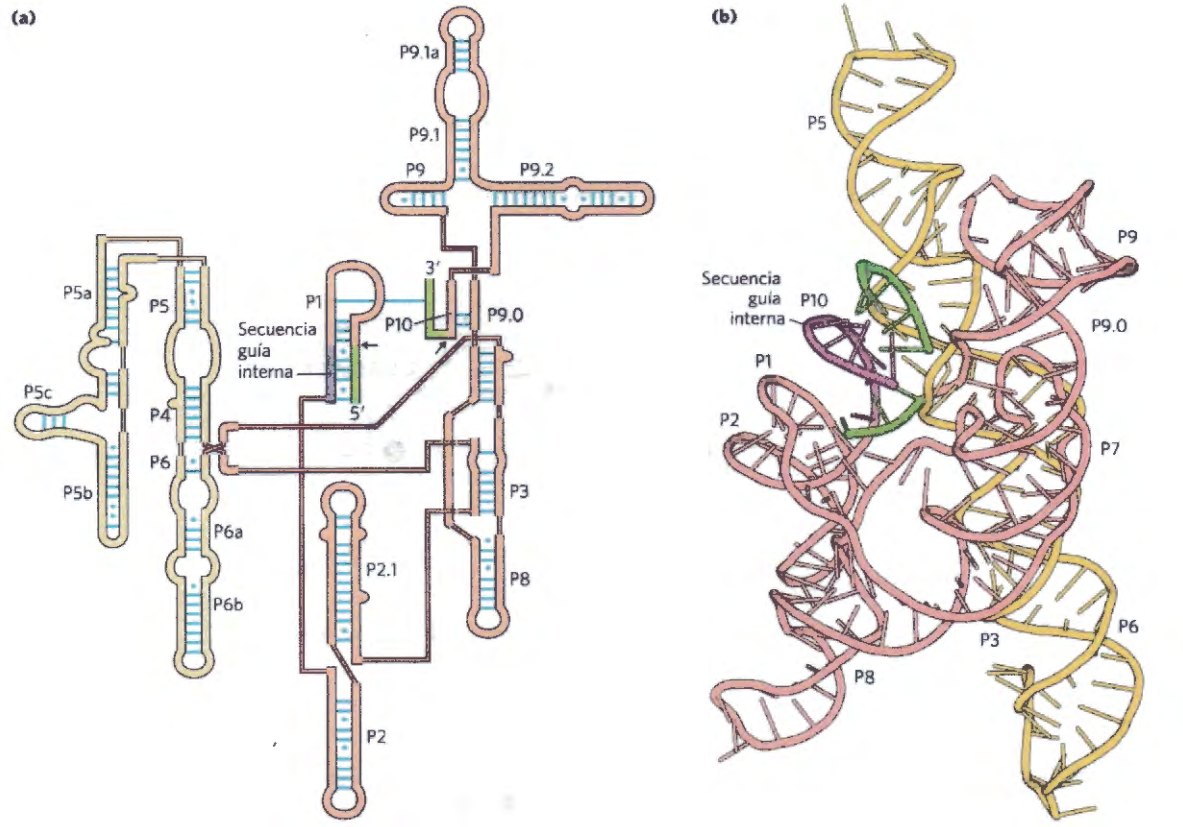


FIGURA 26-29 Estructura secundaria del intrón de autocorte y empalme del rRNA de *Tetrahymena*. **(a)** Representación bidimensional de la estructura secundaria inmediatamente anterior a la iniciación de la reacción. Las secuencias de los intrones y de los exones están sombreadas en amarillo y verde; las secuencias exónicas flanqueantes están sombreadas en verde; las secuencias de guía interna que ayudan a alinear los segmentos que reaccionan en el sitio activo están sombreadas en púrpura. Las líneas rojas finas representan los enlaces entre nucleótidos vecinos en una secuencia continua (necesarias para representar esta molécula compleja en dos dimensiones). Las líneas azules cortas representan un apareamiento normal; los puntos azules indican pares de bases G y U. Se muestran todos los nucleótidos. El núcleo catalítico de la actividad de autocorte y empalme está sombreado en gris. Algunas regiones con apareamiento de bases están marcadas (P1, P3, P2.1, P5a, etc.) según una convención establecida para esta molécula de RNA. La región P1, que contiene la secuencia guía interna (púrpura), incluye el sitio de corte y empalme en 5' (flecha negra). Parte de la secuencia guía interna se aparea con el extremo 3' del exón, aproximando así los sitios de corte y empalme en 5' y 3' (flechas negras). **(b)** Estructura tridimensional del intermedio de reacción del mismo intron después del corte mediado por guanosina (Fig. 26-14) y anterior a la ligación del exón. Los segmentos están coloreados como en **(a)**. [Fuente: **(a)** PDB ID 1GID, J. H. Cate et al., Science 273:1678, 1996. **(b)**(PDB ID 1U6B, P.L. Adamss et al., Nature 430:45, 2004.]

CopyStation

repercusiones importantes en nuestro conocimiento sobre el origen y la evolución de la vida en nuestro planeta, tema discutido en la Sección 26.3.

Los mRNA celulares se degradan a diferentes velocidades

La expresión de los genes está regulada a muchos niveles. Un factor crucial en el gobierno de la expresión génica es la concentración celular del correspondiente RNA. La concentración de cualquier molécula depende de dos factores: su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación. Cuando la síntesis y la degradación de un mRNA están equilibradas, su concentración permanece estacionaria. Un cambio en las velocidades de síntesis o de degradación conduce a la acumulación o a la disminución netas del mRNA. Las vías de degradación garantizan que los mRNA no se acumulen en la célula y sean causa de la síntesis de proteínas innecesarias.

Las tasas de degradación de los mRNA de los diferentes genes eucarióticos varían ampliamente. Los productos génicos que sólo son necesarios durante un breve espacio de tiempo pueden tener sus mRNA con vidas medias del orden de minutos o incluso segundos. Los productos génicos que se necesitan constantemente por la célula pueden tener mRNA estables durante muchas generaciones celulares. La vida media promedio del mRNA en una célula de vertebrado es de unas 3 horas, con un recambio de cada tipo de mRNA de unas 10 veces por generación celular. La vida media de los mRNA bacterianos es mucho más corta, de sólo unos 1,5 min, tal vez por exigencias de la regulación.

El RNA mensajero es degradado por ribonucleasas presentes en todas las células. En *E. coli*, el proceso comienza con uno o unos pocos cortes por una endorribonucleasa, seguidos por degradación 3'→5' por exorribonucleasas. En los eucariotas inferiores la ruta principal consiste en primer lugar en el acortamiento de la cola de poli(A), seguida de la pérdida del casquete del extremo 5' y la degradación del mRNA en dirección 5'→3'. También hay una ruta de degradación en dirección 3'→ 5', que podría ser la ruta principal en los eucariotas superiores. Todos los eucariotas poseen un complejo de hasta 10 exorribonucleasas 3'→ 5' conservadas, deno-

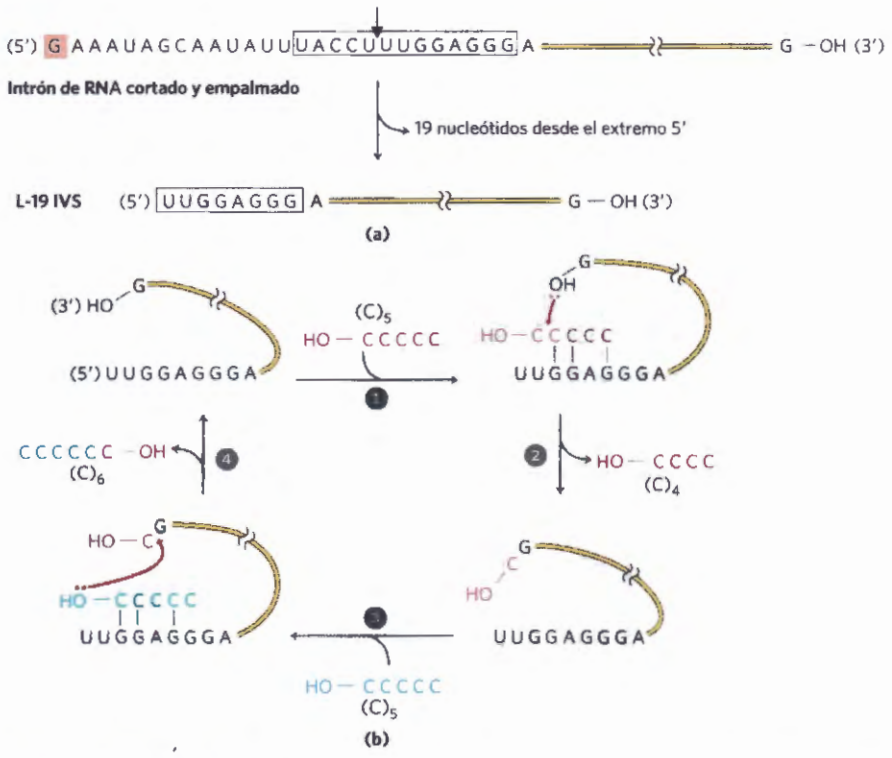


FIGURA 26-30 Actividad catalítica in vitro de L-19 IVS. (a) L-19 IVS se genera mediante la eliminación autocatalítica de 19 nucleótidos del extremo 5' del intrón escindido de *Tetrahymena*. El sitio de corte está indicado por la flecha en la secuencia guía interna (en un recuadro). El residuo G (coloreado en rosa) añadido en la primera parte de la reacción de corte y empalme (véase la Fig. 26-14) forma parte de la secuencia eliminada. Una porción de la secuencia guía interna permanece en el extremo 5' de L-19 IVS. **(b)** L-19 IVS alarga algunos nucleótidos de RNA a expensas de otros en un ciclo de reacciones de transesterificación (pasos ❶ a ❹). El 3' OH del residuo G en el extremo 3' de L-19 IVS juega un papel clave en este ciclo (observe que éste *no* es el residuo G añadido en la reacción de corte y empalme). **(C)**$_5$ es uno de los mejores sustratos del ribozima porque puede aparearse con la secuencia guía que permanece en el interior. Aunque esta actividad catalítica es probablemente irrelevante para la célula, tiene implicaciones importantes para las hipótesis actuales sobre la evolución discutidas al final de este capítulo.

Copy Station

minado **exosoma**, que está implicado en la modificación del extremo 3' de los rRNA y tRNA y algunos RNA de función especializada (incluidos los snRNA y snoRNA), así como en la degradación de los mRNA.

Una estructura en horquilla presente en los mRNA bacterianos con un terminador independiente de ρ (Fig. 26-7) confiere estabilidad frente a la degradación. Estructuras en horquilla similares pueden estabilizar regiones seleccionadas de la estructura de un transcrito primario y causar una degradación no uniforme de los transcritos. En las células eucarióticas, tanto la cola de poli(A) en 3' como el casquete en 5' son importantes para la estabilidad de muchos mRNA. **8Ciclo vital de un mRNA**

La polinucleótido fosforilasa forma polímeros de RNA de secuencia aleatoria

En 1955, Marianne Grunberg-Manago y Severo Ochoa descubrieron el enzima bacteriano **polinucleótido fosforilasa**, que in vitro cataliza la reacción

$$(\text{NMP})n + \text{NDP} \rightleftharpoons \underset{\text{Polinucleótido alargado}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{P}_i$$

La polinucleótido fosforilasa fue el primer enzima sintetizador de ácidos nucleicos descubierto (Arthur Kornberg descubrió la DNA polimerasa poco tiempo después). La reacción catalizada por la nucleótido fosforilasa difiere fundamentalmente de las otras actividades polimerizantes discutidas hasta el momento por ser independiente de molde. El enzima utiliza los ribonucleósidos 5'-difosfato y no pude actuar sobre los 5'-trifosfato homólogos o sobre los desoxirribonucleósidos 5'-difosfato. El polímero de RNA formado por la polinucleótido fosforilasa contiene enlaces 3',5'-fosfodiéster normales, que pueden ser hidrolizados por la ribonucleasa. La reacción es fácilmente reversible y puede ser impulsada en la dirección de la degradación del polinucleótido incrementando la concentración de fosfato. La función probable de este enzima en la célula es la degradación de los mRNA hasta nucleósidos difosfato.

Debido a que la reacción de la polinucleótido fosforilasa no utiliza molde, no forma un polímero con una secuencia de bases específica. La reacción transcurre con igual facilidad con cualquiera de los cuatro nucleósidos difosfato y la composición de bases del polímero resultante refleja las concentraciones relativas de los sustratos 5'-difosfato en el medio.

La polinucleótido fosforilasa se puede utilizar en el laboratorio para la preparación de muchos tipos diferentes de polímeros de RNA con diferentes secuencias y frecuencias de bases. Los polímeros de RNA sintético con estas características fueron de gran importancia para deducir el código genético de los aminoácidos (Capítulo 27).



Marianne Grunberg-Manago, 1921-2013 [Fuente: Philippe Eranian/Sygma/Corbis.]



Severo Ochoa, 1905-1993 [Fuente: AP Images.]

RESUMEN 26.2 Maduración del RNA

- Los mRNA eucarióticos se modifican por adición de un residuo de 7-metilguanosina en el extremo 5' y por corte y poliadenilación en el extremo 3' para formar una larga cola de poli(A).
- Muchos transcritos primarios de mRNA contienen intrones (regiones no codificantes), que son eliminadas por corte y empalme. La escisión de los intrones del grupo I presentes en algunos rRNA requiere guanosina como cofactor. Algunos intrones de los grupos I y II son capaces de autocorte y empalme; no se requieren enzimas proteicos. Los precursores del mRNA nuclear pertenecen a una tercera clase de intrones (la más numerosa), que son eliminados con ayuda de complejos RNA-proteína, denominados snRNP, asociados en espliceosomas. Una cuarta clase de intrones, encontrada en algunos tRNA, es la única clase conocida que experimenta corte y empalme por enzimas proteicos.
- La función de muchos mRNA eucarióticos está regulada por micro RNA complementarios (miRNA). Los propios miRNA proceden de precursores mayores a través de una serie de reacciones de modificación.
- Los RNA ribosómicos y los RNA de transferencia proceden de RNA precursores de mayor tamaño, que son recortados por nucleasas. Algunas bases se modifican enzimáticamente durante el proceso de maduración. Algunas modificaciones de los nucleósidos son guiadas por snoRNA, que forman parte de complejos proteicos denominados snoRNP.
- El autocorte y empalme de los intrones y del componente de RNA de la RNasaP (que corta el extremo 5' de los precursores de tRNA) son dos ejemplos de ribozimas. Estos catalizadores biológicos tienen las propiedades de los auténticos enzimas. Generalmente promueven el corte hidrolítico y la transesterificación, utilizando RNA como sustrato. El intrón escindido del rRNA de *Tetrahymena*, perteneciente al grupo I, es capaz de facilitar combinaciones de estas reacciones, que resultan en un tipo de reacción de polimerización de RNA.
- La polinucleótido fosforilasa forma reversiblemente polímeros de RNA a partir de ribonucleósidos 5'-difosfato, añadiendo o eliminando ribonucleótidos del extremo 3'-hidroxilo del polímero. In vivo, El enzima degrada el RNA.

26.3 Síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA

En nuestra discusión sobre la síntesis de DNA y de RNA hasta el momento, el papel de molde se ha reservado para el DNA. Sin embargo, algunos enzimas utilizan un molde de RNA para la síntesis de ácidos nucleicos. Con la muy importante excepción de los virus con un genoma de RNA, estos enzimas sólo juegan un papel modesto en las rutas de la información. Los virus de RNA han sido la fuente de la mayor parte de las polimerasas dependientes de RNA caracterizadas hasta el momento.

La existencia de la replicación del RNA requiere la modificación del dogma central (**Fig. 26-31**; compárese con el diagrama de la p. 955). Los enzimas de replicación del RNA tienen profundas implicaciones en la investigación sobre la naturaleza de las moléculas autorreplicativas que pueden haber existido en épocas prebióticas.

La transcriptasa inversa produce DNA a partir de RNA vírico

Ciertos virus de RNA que infectan células animales contienen en el interior de la partícula vírica una DNA polimerasa dependiente de RNA denominada **transcriptasa inversa**. Durante la infección, el genoma vírico de RNA monohebra (~10.000 nucleótidos) y el enzima penetran en la célula huésped. La transcriptasa inversa primero cataliza la síntesis de una cadena de DNA complementaria del RNA vírico (**Fig. 26-32**) y, a continuación, degrada la cadena de RNA del híbrido RNA vírico-DNA y lo reemplaza con DNA. El DNA dúplex resultante a menudo queda incorporado en el genoma de la célula eucariótica huésped. Estos genes víricos integrados (y en estado latente) pueden ser activados y transcritos y los productos génicos, proteínas víricas y el propio genoma vírico de RNA, son empaquetados como nuevos virus. Los virus de RNA que contienen transcriptasa inversa son conocidos como **retrovirus** (*retro* es el prefijo latino de "hacia atrás").

La existencia de transcriptasas inversas en virus de RNA fue predicha por Howard Temin en 1962, demostrándose finalmente la existencia de estos enzimas por el propio Temin e, independientemente, por David Baltimore en 1970. Su descubrimiento despertó una gran expectación, porque constituía una prueba, en contra del dogma establecido, de que la información genética puede fluir "hacia atrás", desde el RNA al DNA.



Howard Temin, 1934-1994 [Fuente: Corbis/UPI/Bettmann.]



David Baltimore [Fuente: AP Photo.]

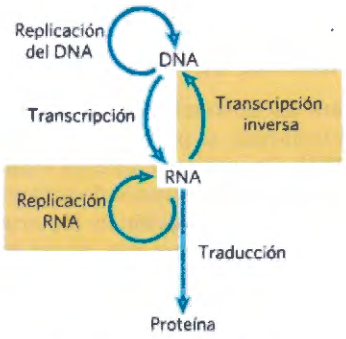


FIGURA 26-31 Ampliación del dogma central que incluye la síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA.

Los retrovirus tienen típicamente tres genes: *gag* (nombre que proviene de la designación histórica *g*roup *a*ssociated antigen), *pol* y *env* **(Fig. 26-33)**. El transcrito que contiene *gag* y *pol* es traducido como una larga "poliproteína" que se corta en seis proteínas con distintas funciones. Las proteínas procedentes del gen *gag* forman el núcleo interior de la partícula vírica. El gen *pol* codifica la proteasa que corta el polipéptido largo, una integrasa que inserta el DNA vírico en los cromosomas del huésped y la transcriptasa inversa. Muchas transcriptasas inversas tienen dos subunidades, α y β. El gen *pol* codifica la subunidad β (M_r 90.000), mientras que la subunidad α (M_r 65.000) es simplemente un fragmento proteolítico de la subunidad β. El gen *env* codifica las proteínas de la cubierta vírica. A cada extremo del genoma lineal de RNA se encuentran repeticiones terminales largas (LTR) de unos pocos centenares de nucleótidos. Una vez transcritas a DNA dúplex, estas secuencias facilitan la integración del cromosoma vírico en el DNA del huésped y contienen promotores que controlan la expresión génica del virus.

Las transcriptasas inversas catalizan tres reacciones diferentes: (1) síntesis de DNA dependiente de RNA, (2) degradación del RNA y (3) síntesis de DNA dependiente de DNA. Como muchas otras DNA y RNA polimerasas, las transcriptasas inversas víricas contienen Zn^{2+}. Cada transcriptasa presenta la máxima actividad con el RNA de su propio virus, pero pueden usarse experimentalmente para producir DNA complementa-

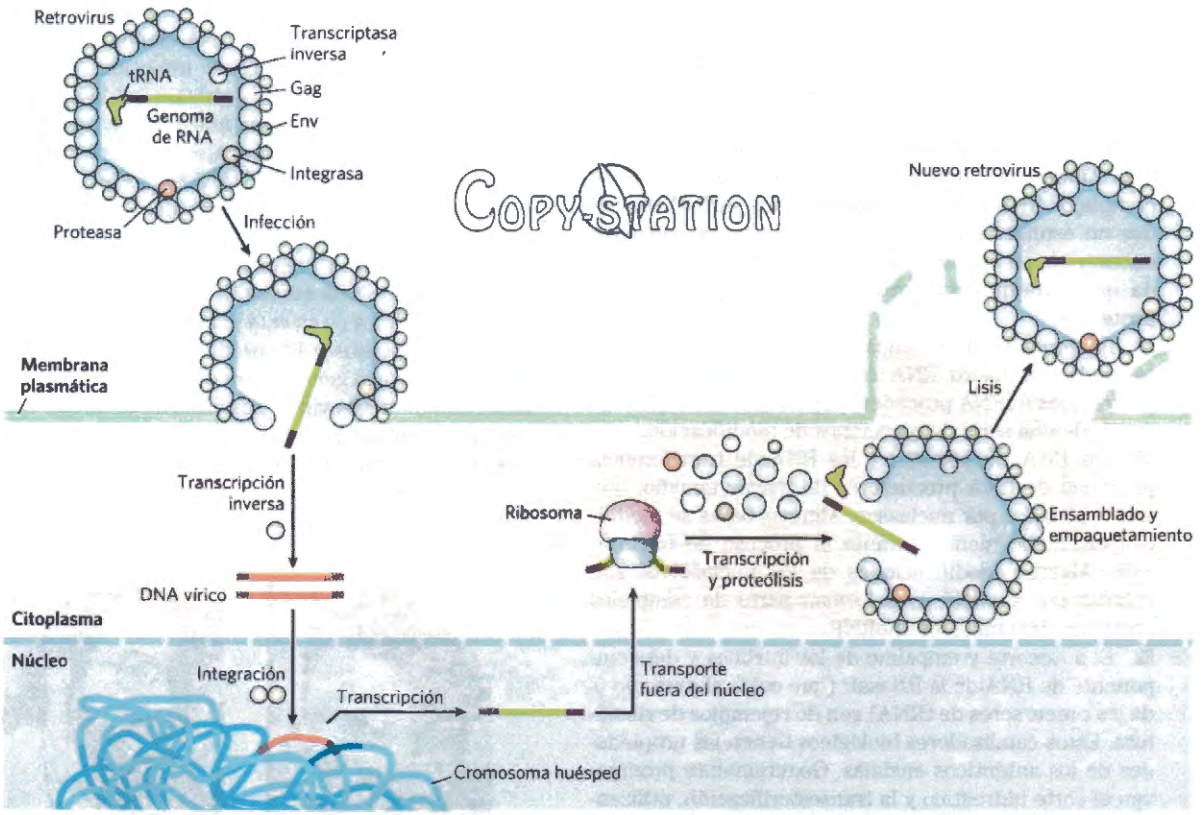


FIGURA 26-32 Infección retrovírica de una célula de mamífero e integración del retrovirus en el cromosoma del huésped. Las partículas víricas que penetran en la célula huésped contienen transcriptasa inversa vírica y un tRNA celular (recogido de una célula huésped anterior) ya apareado con el RNA vírico. Los segmentos de color púrpura representan las repeticiones terminales largas del RNA vírico. El tRNA facilita la conversión inmediata del RNA vírico en DNA de doble cadena por acción de la transcriptasa inversa, tal como se describe en el texto. Una vez convertido en DNA de doble cadena, el DNA entra en el núcleo y se integra en el genoma del huésped. La integración está catalizada por una integrasa codificada por el virus. La integración de DNA vírico en el DNA huésped es mecanísticamente similar a la inserción de transposones en los cromosomas bacterianos (véase la Fig. 25-41). Por ejemplo, se duplican unos cuantos pares de bases del DNA huésped en el sitio de integración, formando repeticiones cortas de 4 a 6 pb en cada extremo del DNA retrovírico insertado (no mostrado). La transcripción y la traducción del DNA vírico integrado da lugar a nuevos virus que se liberan por lisis celular (derecha). En los viirus, el RNA vírico está confinado por las proteínas de la cápsida denominadas Gag y las proteínas de la envoltura externa denominadas Env. Otras proteínas víricas (transcriptasa inversa, integrasa y una proteasa vírica necesarias para la modificación postraducción de las proteínas víricas) están empaquetadas dentro de la partícula vírica junto con el RNA.

rio de muchos RNA. Las actividades de síntesis de DNA y RNA y de degradación de RNA utilizan sitios activos separados en la proteína. La transcriptasa inversa requiere un cebador para iniciar la síntesis de DNA. El cebador es un tRNA transportado por la partícula vírica, obtenido durante una infección anterior. Este tRNA se aparea con una secuencia complementaria del extremo 3' del RNA vírico. La nueva cadena de DNA se sintetiza en dirección 5'→3', como en todas las reacciones de las RNA y DNA polimerasas. Las transcriptasas inversas, al igual que las RNA polimerasas, carecen de actividad exonucleasa 3'→5' correctora de pruebas. Generalmente, tienen una tasa de error de aproximadamente 1 por cada 20.000 nucleótidos añadidos. Una tasa de error tan alta es muy poco frecuente en la replicación del DNA y constituye un rasgo característico de los enzimas que replican los genomas de RNA víricos. Ello resulta en una tasa más alta de mutación y en una velocidad de evolución vírica más elevada, que redunda en la aparición frecuente de nuevas cepas de retrovirus patógenos.

Las transcriptasas inversas se han convertido en reactivos importantes en el estudio de las relaciones DNA-RNA y en las técnicas de clonaje del DNA. Hacen posible la síntesis de un DNA complementario de un molde de mRNA. El DNA sintético preparado de esta manera, denominado **DNA complementario (cDNA)**, puede ser usado para clonar genes celulares (véase la Fig. 9-14).

Algunos retrovirus provocan cáncer y SIDA

Los retrovirus han jugado un papel destacado en el avance del conocimiento molecular sobre el cáncer. La mayoría de los retrovirus no matan a sus células huésped, sino que permanecen integrados en el DNA celular y se replican cuando la célula se divide. Algunos retrovirus, clasificados como virus tumorales de RNA, contienen un oncogén que provoca el crecimiento anormal de la célula. El primer virus de este tipo estudiado fue el virus del sarcoma de Rous (también denominado virus del sarcoma de las aves; **Fig. 26-34**), nombrado en consideración a F. Peyton Rous, que estudió los tumores de los pollos, que en la actualidad se sabe que están provocados por este virus. Desde el descubrimiento de los oncogenes por Harold Varmus y Michael Bishop, se han encontrado muchos de estos genes en los retrovirus.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es un retrovirus. Identificado en 1983, el VIH tiene un genoma de RNA con genes retrovíricos estándar junto con otros genes infrecuentes **(Fig. 26-35)**. A diferencia de otros muchos retrovirus, el VIH mata muchas de las células que infecta (principalmente linfocitos T), en lugar de provocar la formación de tumores. Ello lleva a la eliminación gradual del sistema inmunitario del organismo huésped. La transcriptasa inversa del VIH es incluso más propensa al error que otras transcriptasas inversas conocidas, aproximadamente unas diez veces más, hecho que explica las elevadas tasas de mutación de este virus. Cada vez que se replica el genoma vírico se producen uno o más errores, de modo que dos moléculas de RNA vírico son generalmente diferentes.

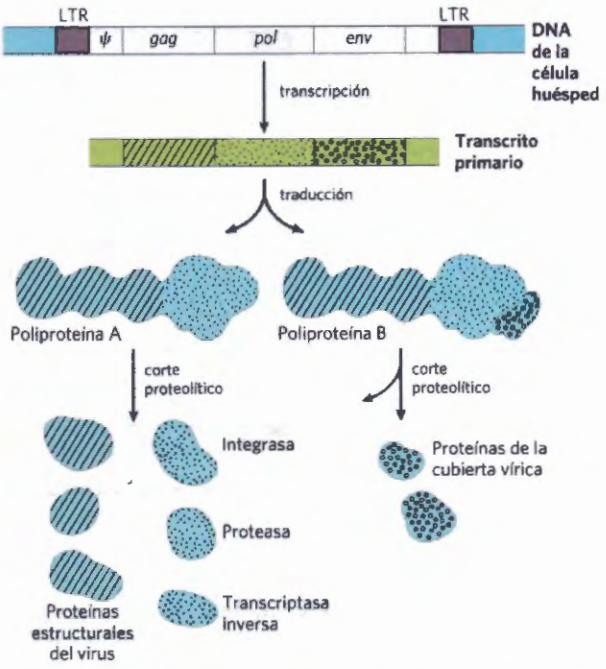


FIGURA 26-33 Estructura y productos génicos de un genoma integrado de un retrovirus. Las repeticiones terminales largas (LTR) tienen secuencias que son necesarias para la regulación e inicio de la transcripción. La secuencia designada por ψ es necesaria para el empaquetamiento de los RNA retrovíricos en partículas víricas maduras. La transcripción del DNA retrovírico produce un transcrito primario que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*. La traducción (Capítulo 27) produce una poliproteína, un único polipéptido largo derivado de los genes *gag* y *pol*, que se corta dando seis proteínas distintas. El corte y empalme del transcrito primario da un mRNA derivado principalmente del gen *env*, que también se traduce como una poliproteína, que se corta a continuación para generar las proteínas de la cubierta del virus.

Muchas vacunas modernas para las infecciones víricas consisten en una o más proteínas de la cubierta del virus, producidas por los métodos descritos en el Capítulo 9. Estas proteínas no son infecciosas por sí mismas, pero estimulan al sistema inmunitario para que reconozca y resista las infecciones virales posteriores (Capítulo 5). Debido a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa del VIH, el gen *env* de este virus (junto con el resto del genoma) muta muy rápidamente, lo que complica el desarrollo de una vacuna efectiva. Sin embargo, se necesitan ciclos repetidos de invasión celular y replicación para propagar la infección por el VIH, de modo que la inhibición de los enzimas virales constituye la terapia más efectiva actualmente disponible. La proteasa del VIH es la diana de una clase de fármacos denominados inhibidores de la proteasa (véase la Fig. 6-25). La transcriptasa inversa es la diana de otros fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de individuos infectados por VIH (Recuadro 26-2). ■

Muchos transposones, retrovirus e intrones pueden tener un origen evolutivo común

Algunos transposones eucarióticos de DNA bien caracterizados, de orígenes tan dispares como la levadura y la mosca del vinagre, tienen una estructura muy similar a la de los retrovirus, por lo que a veces se los denomina



FIGURA 26-34 Genoma del virus del sarcoma de Rous. El gen *src* codifica una tirosina quinasa, perteneciente a una clase de enzimas que actúan en sistemas que intervienen en la división celular, las interacciones intercelulares y la comunicación intercelular (Capítulo 12). El mismo gen se encuentra en el DNA de pollo (el huésped usual de este virus) y en los genomas de otros muchos eucariotas, entre ellos el hombre. Cuando se asocia con el virus del sarcoma de Rous, este oncogén se expresa a menudo a niveles anormalmente elevados, con lo que contribuye a la división celular no regulada y al cáncer.

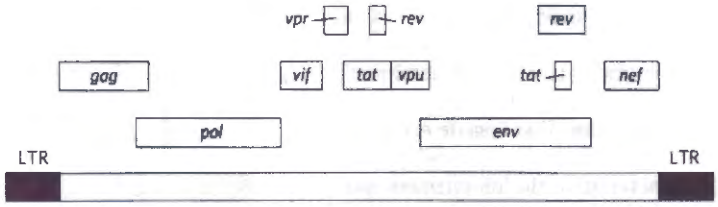


FIGURA 26-35 Genoma del VIH, el virus que provoca el SIDA. Además de los genes retrovíricos típicos, el VIH contiene varios genes pequeños que tienen diversas funciones (no identificadas aquí y no todas conocidas). Algunos de estos genes están solapados. Mecanismos de corte y empalme alternativos producen muchas proteínas diferentes a partir de este pequeño genoma ($9{,}7 \times 10^3$ nucleótidos).

retrotransposones **(Fig. 26-36)**. Los retrotransposones codifican un enzima homólogo de la transcriptasa inversa retroviral y sus regiones codificantes están flanqueadas por secuencias LTR. Se transponen de una posición a otra del genoma celular por medio de un intermedio de RNA, utilizando probablemente la transcriptasa inversa para hacer una copia de DNA a partir del RNA que, acto seguido, se integra en un nuevo sitio. La mayoría de transposones eucarióticos utilizan este mecanismo de transposición, mientras que los transposones bacterianos se trasladan en forma de DNA directamente de una localización cromosómica a otra (véase la Fig. 25-42).

Los retrotransposones carecen del gen *env* y por tanto no pueden formar partículas víricas. Puede ser considerados como virus defectuosos atrapados en las células. La comparación de los retrovirus y los transposones eucarióticos sugiere que la transcriptasa inversa es un enzima antiguo, anterior a la evolución de los organismos multicelulares.

Muchos intrones del grupo I y del grupo II son también elementos genéticos móviles. Además de sus actividades de autocorte y empalme, codifican endonucleasas de DNA que promueven su desplazamiento. Durante el intercambio genético entre células de la misma especie, o cuando DNA es introducido en una célula por parásitos o por otros medios, estas endonucleasas promueven la inserción del intrón en un sitio idéntico de otra copia de DNA de un gen homólogo que no contenga el intrón, en un proceso denominado **alojamiento (homing)** **(Fig. 26-37)**. Mientras que en los intrones del grupo I el alojamiento se basa en el DNA, en los intrones del grupo II el alojamiento tiene lugar a través de un intermedio de RNA. Las endonucleasas de los intrones del grupo II poseen actividad transcriptasa inversa asociada. Las proteínas pueden formar complejos con los propios intrones de RNA después de que los intrones se hayan escindido de los transcritos primarios. Puesto que el proceso de alojamiento implica la inserción del intrón de RNA en el DNA y la transcripción inversa del intrón, el movimiento de estos intrones ha sido denominado retroalojamiento. Con el tiempo, cada copia de un gen particular puede adquirir el intrón. Mucho más raramente, el intrón puede insertarse en una nueva localización en un gen no relacionado. Si ello no mata a la célula huésped, puede desembocar en la evolución y distribución de un intrón en una nueva localización. Las estructuras y mecanismos usados por los intrones móviles apoyan la idea de que al menos algunos intrones fueron en su origen parásitos moleculares, cuyo pasado evolutivo puede remontarse hasta los retrovirus y los transposones.

COPY-STATION

La telomerasa es una transcriptasa inversa especializada

Los telómeros son las estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas eucarióticos lineales (véase la Fig. 24-8). Consisten generalmente en muchas copias en tándem de una corta secuencia oligonucleotídica, normalmente del tipo T_xG_y en una hebra y C_yA_x en la hebra complementaria, donde x e y se encuentran típicamente en el intervalo de 1 a 4. La longitud de los telómeros varía entre unas pocas docenas de pares de bases en algunos protozoos ciliados hasta decenas de miles de pares de bases en los mamíferos. La hebra TG es más larga que la complementaria, de manera que queda una región de DNA de cadena sencilla de hasta unos pocos centenares de nucleótidos en el extremo 3'.

Los extremos de un cromosoma lineal no pueden ser replicados por las DNA polimerasas celulares. La replicación del DNA requiere un molde y un cebador,

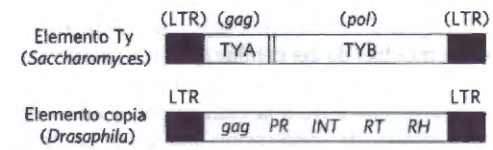


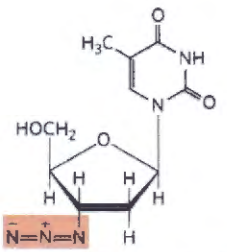
FIGURA 26-36 Transposones eucarióticos. El elemento Ty de la levadura *Saccharomyces* y el elemento copia de *Drosophila* (mosca del vinagre) son ejemplos de retrotransposones eucarióticos, que tienen a menudo una estructura similar a los retrovirus, aunque carecen del gen *env*. Las secuencias δ del elemento Ty son funcionalmente equivalentes a los LTR retrovíricos. En el elemento copia, *INT* y *RT* son homólogos a los segmentos de la integrasa y de la transcriptasa inversa, respectivamente, del gen *pol*.

RECUADRO 26-2 MEDICINA Tratamiento del SIDA con inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH

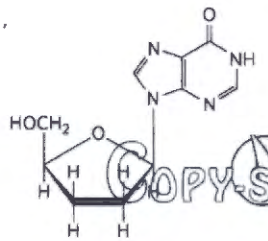
La investigación de la química de la biosíntesis de ácidos nucleicos dependiente de molde, combinada con las técnicas modernas de la biología molecular, ha permitido conocer el ciclo vital y la estructura del virus de la inmunodeficiencia humana (vih), el retrovirus que causa el SIDA. Pocos años después del aislamiento del VIH, estas investigaciones desembocaron en el desarrollo de fármacos capaces de alargar la vida de las personas infectadas por el VIH.

El primer fármaco en ser aprobado para uso clínico fue el AZT, un análogo estructural de la desoxitimidina. El AZT fue sintetizado por primera vez en 1964 por Jerome P. Horwitz. Fracasó como fármaco anticancerígeno (objetivo para el cual fue desarrollado), pero en 1985 se descubrió que era útil para el tratamiento del SIDA. El AZT es incorporado por los linfocitos T, células de sistema inmunitario particularmente vulnerables al VIH, y convertido en AZT trifosfato. (El AZT trifosfato no puede ser administrado directamente porque no sería efectivo al no poder atravesar la membrana plasmática). La transcriptasa inversa del VIH tiene más afinidad por el AZT trifosfato que por el dTTP y la unión del AZT trifosfato a este enzima inhibe competitivamente la unión de dTTP. Cuando el AZT es añadido al extremo 3' de la cadena de DNA en crecimiento, la ausencia de un grupo 3' hidroxilo provoca que la síntesis de la cadena de DNA termine prematuramente y la síntesis del DNA vírico cesa rápidamente.

El AZT trifosfato no es tóxico para los propios linfocitos T porque las DNA polimerasas *celulares* tienen menos afinidad por este compuesto que por el dTTP. A concentraciones de 1 a 5 μM, el AZT afecta a la transcripción inversa del VIH, pero no a la replicación del DNA celular. Lamentablemente, el AZT es tóxico para las células de la médula ósea que son progenitoras de los eritrocitos por lo que los pacientes que toman AZT a menudo desarrollan anemia. El AZT puede aumentar la supervivencia de pacientes con SIDA avanzado en un año y retrasa la aparición de los síntomas del SIDA en los individuos que se encuentran en las primeras etapas de la infección por VIH. Algunos otros fármacos contra el SIDA, como la desoxiinosina (DDI), tienen un mecanismo de acción similar. Fármacos más recientes se unen e interaccionan con la proteasa del VIH. Debido a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa del VIH y la rápida evolución resultante del VIH, los tratamientos más eficaces contra la infección por el VIH usan una combinación de fármacos dirigida a la vez contra la proteasa y la transcriptasa inversa.



3'-Azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT)



2',3'-Didesoxiinosina (DDI)

COPY-STATION



Carol Greider [Fuente: Cortesía de Carol Greider.]



Elizabeth Blackburn [Fuente: Elisabeth Fall/Fallfoto.com.]

pero más allá del extremo de una molécula de DNA lineal no hay molde disponible para el apareamiento del cebador de RNA. Sin un mecanismo especial para replicar los extremos, los cromosomas se acortarían algo en cada generación celular. El problema lo soluciona un enzima denominado **telomerasa**, descubierto por Carol Greider y Elizabeth Blackburn, que incorpora telómeros a los extremos de los cromosomas.

El descubrimiento y purificación de este enzima aclaró un mecanismo de reacción que es destacable y no tiene precedentes. La telomerasa, lo mismo que otros enzimas descritos en este capítulo, contiene tanto RNA como proteína. El componente de RNA tiene una longitud de unos 150 nucleótidos y contiene alrededor de 1,5 copias de la repetición telomérica C_yA_x adecuada. Esta parte del RNA actúa de molde para la síntesis de la hebra T_xG_y del telómero. De este modo, la telomerasa actúa como una transcriptasa inversa celular que proporciona el sitio activo para la síntesis de DNA dependiente de RNA. A diferencia de las transcriptasas inversas de los retrovirus, la telomerasa sólo copia un pequeño segmento de RNA que lleva consigo. La síntesis del telómero requiere el extremo 3' de un cromosoma como cebador y progresa en la dirección habitual 5'→3'. Una vez sintetizada una copia de la repetición, el enzima se posiciona de nuevo para reemprender la extensión del telómero **(Fig. 26-38a)**.

Después de la extensión de hebra T_xG_y por la telomerasa, se sintetiza la hebra complementaria C_yA_x por las DNA polimerasas celulares a partir de un cebador de RNA (véase la Fig. 25-12). La región de cadena sencilla está protegida por proteínas de unión específicas en muchos eucariotas inferiores, especialmente en aquellos con telómeros con menos de unos pocos centenares de pares de bases. En los eucariotas superiores (incluídos los mamíferos), con telómeros con muchos miles de pares de bases, el extremo 3' está secuestrado en una estructura especializada denominada **lazo T** (Fig. 26-38b). El extremo de

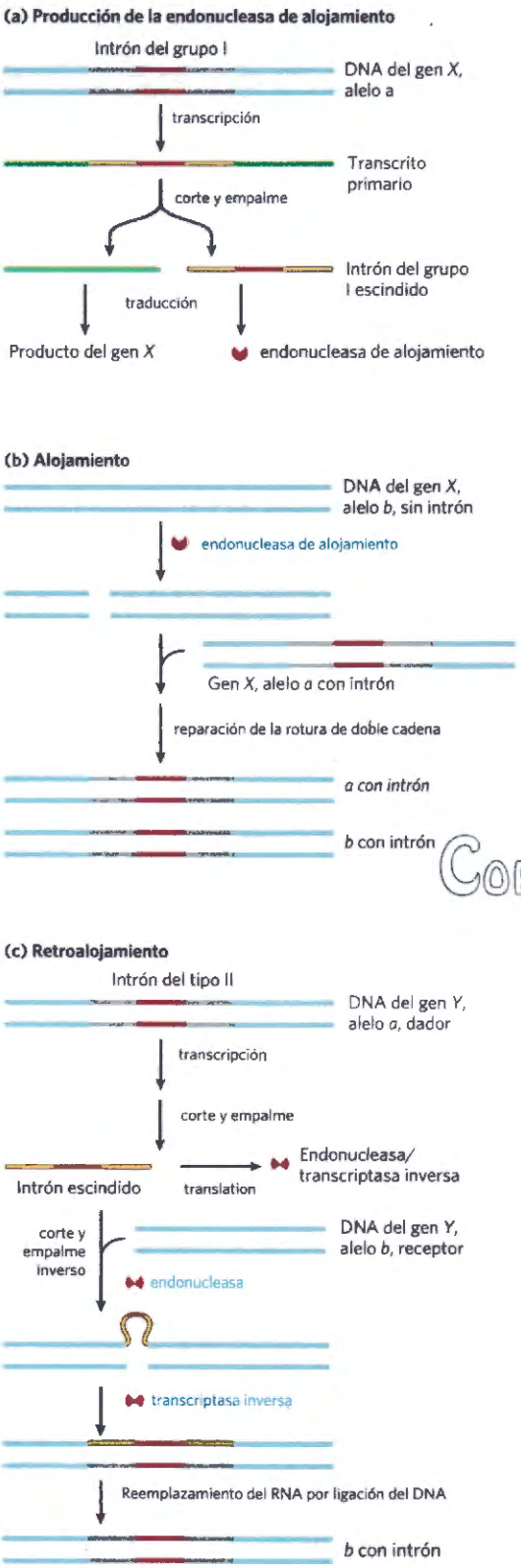


FIGURA 26-37 Intrones que se mueven: alojamiento y retroalojamiento. Ciertos intrones incluyen un gen (mostrado en rojo) para enzimas que promueven el alojamiento (ciertos intrones de tipo I) o el retroalojamiento (ciertos intrones de tipo II). **(a)** El gen con el intrón escindido se une a un ribosoma y es traducido. Los intrones de alojamiento del tipo I codifican una endonucleasa específica de sitio, denominada endonucleasa de alojamiento. Los intrones de retroalojamiento del grupo II codifican una proteína específica con actividades tanto endonucleasa como transcriptasa inversa (no se muestra aquí).

(b) Alojamiento. El alelo *a* del gen *X*, que contiene un intrón de alojamiento del tipo I, se encuentra en una célula que contiene el alelo *b* del mismo gen que carece del intrón. La endonucleasa de alojamiento producida por *a* corta *b* en la posición correspondiente al intrón de *a* y la reparación de rotura de cadena doble (recombinación con el alelo *a*; véase la Fig. 25-35) crea entonces una nueva copia del intrón en *b*. **(c)** Retroalojamiento. El *alelo a* del gen *Y* contiene un intrón de retroalojamiento del grupo II; el alelo *b* carece de intrón. El intrón escindido se inserta en la hebra codificante de *b* en una reacción que es la inversa del corte y empalme que escindió el intrón del transcrito primario (véase la Fig. 26-15), excepto que en este caso la inserción es en el DNA en lugar del RNA. la hebra de DNA no codificante de *b* se corta por la endonucleasa/transcriptasa inversa codificada por el intrón. Este mismo enzima usa el RNA insertado como molde para sintetizar una hebra de DNA complementaria. A continuación se degrada el RNA por ribonucleasas celulares y se reemplaza con DNA.

cadena sencilla está plegado y apareado con su secuencia complementaria en la región de doble cadena del telómero. La formación del lazo T implica la invasión del DNA dúplex por el extremo 3' de cadena sencilla del telómero, quizá por un mecanismo similar al del iniciode la recombinación genética homóloga (véase la Fig. 25-35). En los mamíferos, el DNA del lazo está unido a dos proteínas, TRF1 y TRF2, esta última implicada en la formación del lazo T. Los lazos T protegen los extremos 3' de los cromosomas, haciéndolos inaccesibles a las nucleasas y a los enzimas que reparan roturas de doble cadena.

En los protozoos (tales como *Tetrahymena*) la pérdida de la actividad telomerasa da lugar a un acortamiento gradual de los telómeros con cada división celular, que acaba con la muerte de la línea celular. En humanos se ha observado una relación similar entre la longitud de los telómeros y el envejecimiento celular (cese de la división celular). En las células germinales, que contienen actividad telomerasa, se mantiene la longitud de los telómeros, pero no así en las células somáticas, que carecen de telomerasa. Existe una relación lineal inversa entre la longitud de los telómeros en fibroblastos cultivados y la edad del individuo del cual proceden: los telómeros de las células somáticas humanas se acortan gradualmente a medida que el individuo envejece. Si se introduce la telomerasa en las células somáticas humanas in vitro, se restablece la actividad telomerasa y la esperanza de vida celular aumenta considerablemente.

¿El acortamiento gradual de los telómeros es clave en el proceso de envejecimiento? ¿La duración natural de nuestra vida está determinada por la longitud de los telómeros con que nacemos? La investigación en este campo podría proporcionar algunos descubrimientos fascinantes.

Algunos RNA se replican mediante una RNA polimerasa dependiente de RNA

Aparte de los retroviruses, los virus de RNA incluyen algunos bacteriófagos de *E. coli*, entre los que se encuentran f2, MS2, R17 y Qβ, así como algunos virus eucarióticos (como el virus de la gripe y el Sindbis, éste útimo asociado a una forma de encefalitis). Los cromosomas de RNA monocatenario de estos virus también

actúan como mRNA para la síntesis de las proteínas víricas. Se replican en las células huésped por una **RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA replicasa).** Todos los virus de RNA, a excepción de los retrovirus, tienen que codificar una proteína con actividad RNA polimerasa dependiente de RNA, ya sea porque las células huésped no poseen este enzima o porque la estructura del genoma de RNA de un virus impone requerimientos enzimáticos específicos.

La RNA replicasa de la mayoría de bacteriófagos de RNA tiene una masa molecular de ~210.000 y consta de cuatro subunidades. Una de estas subunidades (M_r 65.000), producto del gen vírico de la replicasa, está codificada en el RNA vírico; esta subunidad contiene el sitio activo para la replicación. Las otras tres subunidades son proteínas del huésped que intervienen normalmente en la síntesis de proteínas del huésped: los factores de elongación Tu (M_r 45.000) y Ts (M_r 34.000) de *E. coli* (que normalmente transportan los aminoacil-tRNA al ribosoma) y la proteína S1 (que es parte integrante de la subunidad ribosómica 30S). Estas tres proteínas del huésped pueden ayudar a la RNA replicasa a localizar y a fijarse a los extremos 3' de los RNA víricos.

La RNA replicasa, aislada de células de *E. coli* infectadas con $Q\beta$, cataliza la formación de un RNA complementario del RNA vírico, en una reacción equivalente a la catalizada por las RNA polimerasas dependientes de DNA. La síntesis de la nueva hebra de RNA se realiza en dirección 5'→3', mediante un mecanismo químico idéntico al de otras reacciones de síntesis de ácidos nucleicos que requieren un molde. La RNA replicasa requiere RNA como molde y no funciona con DNA. El enzima carece de actividad endonucleasa correctora de pruebas y tiene una frecuencia de errores similar a la de la RNA polimerasa. A diferencia de las DNA y RNA polimerasas, las RNA replicasas son específicas para el RNA del propio virus; generalmente no se replican los RNA de la célula huésped. Ello explica por qué se replican preferentemente los RNA víricos en la célula huésped, que contiene muchos otros tipos de RNA.

Las RNA polimerasas dependientes de RNA no son exclusivas de virus. Se encuentran enzimas de este tipo

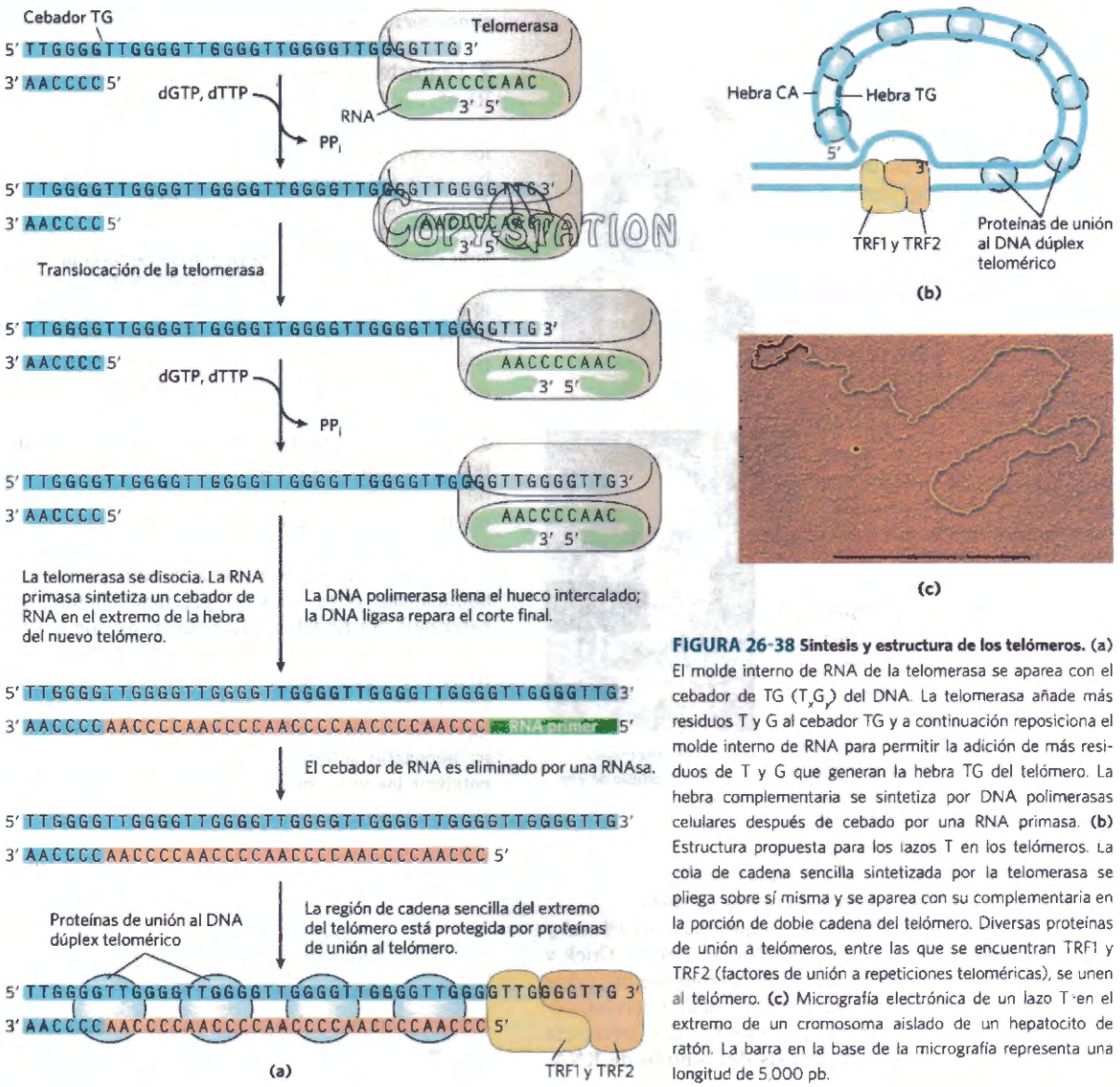


FIGURA 26-38 Síntesis y estructura de los telómeros. **(a)** El molde interno de RNA de la telomerasa se aparea con el cebador de TG (T_xG_y) del DNA. La telomerasa añade más residuos T y G al cebador TG y a continuación reposiciona el molde interno de RNA para permitir la adición de más residuos de T y G que generan la hebra TG del telómero. La hebra complementaria se sintetiza por DNA polimerasas celulares después de cebado por una RNA primasa. **(b)** Estructura propuesta para los lazos T en los telómeros. La cola de cadena sencilla sintetizada por la telomerasa se pliega sobre sí misma y se aparea con su complementaria en la porción de doble cadena del telómero. Diversas proteínas de unión a telómeros, entre las que se encuentran TRF1 y TRF2 (factores de unión a repeticiones teloméricas), se unen al telómero. **(c)** Micrografía electrónica de un lazo T en el extremo de un cromosoma aislado de un hepatocito de ratón. La barra en la base de la micrografía representa una longitud de 5.000 pb.

en plantas, protistas, fungi y algunos animales más simples, pero no en insectos o mamíferos. Estas enzimas que se encuentran en los genomas eucariotas participan en el metabolismo de otra clase de RNA, los llamados RNA pequeños de interferencia (siRNA), y que participan en la regulación génica (Capítulo 28). La mayoría de RNA polimerasas dependientes de RNA han recibido muy poca atención a nivel experimental.

La síntesis de RNA ofrece pistas sobre el origen de la vida en un mundo de RNA

El orden y complejidad extraordinarios que distinguen a los seres vivos de los inanimados son la manifestación clave de procesos vitales fundamentales. El mantenimiento de la vida requiere que se produzcan rápidamente numerosas transformaciones químicas *específicas*, especialmente las que utilizan fuentes energéticas ambientales y las que sintetizan macromoléculas complejas y especializadas. La vida depende de catalizadores poderosos y selectivos, los enzimas, y de sistemas de información capaces de almacenar las características de estos enzimas y de reproducirlas de forma precisa de generación en generación. Los cromosomas no codifican las células, sino la estructura de los enzimas necesarios para construir y mantener la célula. Las necesidades paralelas de información y catálisis plantean el dilema clásico: ¿qué fue primero, la información necesaria para especificar la estructura o los enzimas necesarios para mantener y transmitir la información?



Carl Woese
[Fuente: AP Photo.]



Francis Crick, 1916-2004
[Fuente: AP Images.]



Leslie Orgel, 1927-2007
[Fuente: © Cortesía de The Salk Institute for Biological Studies.]

¿Cómo puede haber surgido un polímero autorreplicativo? ¿Cómo podría haberse mantenido en un medio donde escaseaban los precursores para la síntesis de polímeros? ¿Cómo pudo avanzar la evolución desde un polímero con estas características hasta el mundo moderno de proteínas y DNA? Estas difíciles preguntas pueden ser afrontadas mediante la experimentación sobre cómo empezó y evolucionó la vida en nuestro planeta.

El descubrimiento de la complejidad estructural y funcional del RNA llevó a Carl Woese, Francis Crick y Leslie Orgel a proponer que esta macromolécula podría tener funciones tanto catalíticas como informativas. Desde ese momento, hay al menos 6 líneas de evidencia que han alimentado la **hipótesis del mundo de RNA.**

1. Experimentos químicos prebióticos El origen probable de las bases púricas y pirimidínicas puede emanar de los experimentos encaminados a comprobar hipótesis sobre la química prebiótica (pp. 33-34). A partir de moléculas simples presentes probablemente en la atmósfera primigenia (CH_4, NH_3, H_2O, H_2), las descargas eléctricas simulando rayos y relámpagos, generaron, primero, moléculas más reactivas tales como HCN y aldehídos y luego una serie de aminoácidos y ácidos orgánicos (véase la Fig. 1-35). Cuando moléculas tales como el HCN se vuelven abundantes se sintetizan bases púricas y pirimidínicas en cantidades detectables. Es destacable que una disolución concentrada de cianuro amónico sometida a reflujo durante unos pocos días genera adenina con un rendimiento del 0.5% **(Fig. 26-39)**. La adenina probablemente haya sido el primer constituyente nucleotídico, y el más abundante, en aparecer sobre la Tierra. Curiosamente, la mayoría de los cofactores enzimáticos contienen adenosina como parte de su estructura, a pesar de que la adenosina no juega un papel directo en la función del cofactor (véase la Fig. 8-41). Ello sugiere una relación evolutiva: en base a la sencilla síntesis de la adenina a partir del cianuro, la adenina pudo haber sido simplemente abundante y disponible.

2. La existencia de RNA catalíticos En un "mundo de RNA", los RNA, no las proteínas, actúan como catalizadores. Quizás más que otra cosa, el descubrimiento de los RNA catalíticos (ribozimas) en los 80s dio vida a la hipótesis del mundo de RNA y condujo a la especulación extensiva que un mundo de RNA podría haver sido importante en la transición de la química prebiótica a la vida (véase Fig. 1-37). El padre de de toda la vida en el planeta, en el sentido que se podría haber reproducido el mismo a través de las generaciones des de el origen de la vida al presente, puede haber sido un RNA auto-replicativo, o un polímero con características químicas equivalentes.

3. La extensión catalítica del repertorio de ribozimas Un polímero autorreplicativo agotaría pronto las reservas de precursores suministrados por los relativamente lentos procesos de la química prebiótica. Por tanto, desde las primeras etapas de la evolución fue necesario disponer de rutas metabólicas que generaran precursores en abundancia, cuya síntesis, presumiblemente, estaría catalizada por ribozimas. Los ribozimas que se encuentran en la naturaleza poseen un repertorio limitado de funciones catalíticas, y de los ribozimas que podrían haber existido no queda rastro alguno. Para explorar la hipótesis de un mundo de RNA con mayor profundidad es necesario saber si el RNA tiene el potencial para catalizar las muy diversas reacciones requeridas en un sistema primitivo de rutas metabólicas.

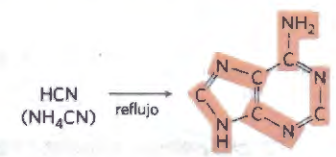


FIGURA 26-39 Posible síntesis prebiótica de adenina a partir de cianuro amónico. La adenina procede de cinco moléculas de cianuro, que se muestran coloreadas.

RECUADRO 26-3 MÉTODOS El método SELEX para generar polímeros de RNA con nuevas funciones

El **SELEX** (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) se usa para generar **aptámeros**, oligonucleótidos seleccionados para que se unan fuertemente a una diana molecular específica. En general, el proceso está automatizado para permitir la rápida identificación de uno o más aptámeros con la especificidad de unión deseada.

La Figura 1 muestra cómo se usa el SELEX para seleccionar una especie de RNA que se una fuertemente al ATP. En el paso ❶, una mezcla al azar de polímeros de RNA se somete a una "selección no natural", haciéndola pasar por una resina a la cual se ha unido ATP. El límite práctico de la complejidad de una mezcla de RNA son 10^{15} secuencias diferentes, lo que permite promediar completamente 25 nucleótidos ($4^{25} = 10^{15}$). Para RNA más largos, el conjunto de RNA utilizados para iniciar la búsqueda no incluye todas las secuencias posibles. Los polímeros de RNA que pasan a través de la columna son descartados (paso ❷); los que se unen al ATP son eluidos de la columna con una disolución salina y recogidos (paso ❸). En el paso ❹ Los polímeros de RNA recuperados son amplificados con transcriptasa inversa para hacer muchas copias de DNA complementarias de los RNA seleccionados; a continuación una RNA polimerasa hace muchas copias de RNA complementarias de las moléculas de DNA resultantes. Finalmente, en el paso ❺, Este conjunto de RNA se somete al mismo procedimiento de selección y el ciclo se repite una docena de veces o más. Al final, sólo quedan unos pocos aptámeros, en este caso secuencias de RNA con una considerable afinidad por el ATP.

En la Figura 2 se muestran las características secuenciales críticas de un aptámero de RNA que se une al ATP; las moléculas con esta estructura general se unen al ATP (y a otros nucleótidos de adenosina) con una $K_d < 50$ μM. La Figura 3 muestra la estructura tridimensional de un aptámero de RNA de 36 nucleótidos (mostrado formando un complejo con AMP) generado por SELEX. Este RNA posee la estructura mostrada en la Figura 2.

Además de sus usos en la investigación de la funcionalidad potencial del RNA, el SELEX puede ser útil en la identificación de RNA cortos de utilidad farmacológica. Encontrar un aptámero que se una específicamente a todas las dianas terapéuticas potenciales puede ser imposible, pero la capacidad del SELEX para seleccionar y amplificar con rapidez una secuencia oligonucleotídica específica entre una compleja variedad de secuencias puede ser útil para desarrollar nuevas terapias. Por ejemplo, puede ser factible seleccionar un RNA que se una fuertemente a una proteína de receptor presente en células tumorales. El bloqueo de la actividad del receptor o el direccionamiento de una toxina hacia las células tumorales mediante su unión al aptámero mataría las células. El SELEX también se ha usado para seleccionar aptámeros de DNA que detectan esporas del ántrax. Muchas otras prometedoras aplicaciones se encuentran en curso de desarrollo. ■

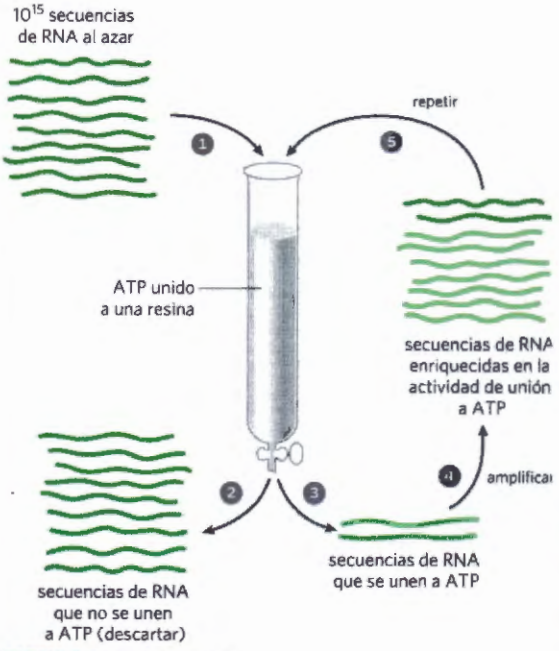


FIGURA 1 El método SELEX

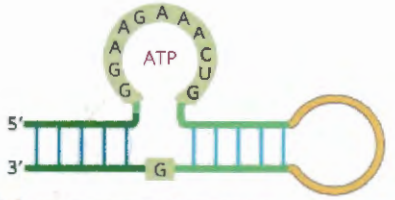


FIGURA 2 Aptámero de RNA que se une a ATP. Los nucleótidos sombreados son los necesarios para la actividad de unión.

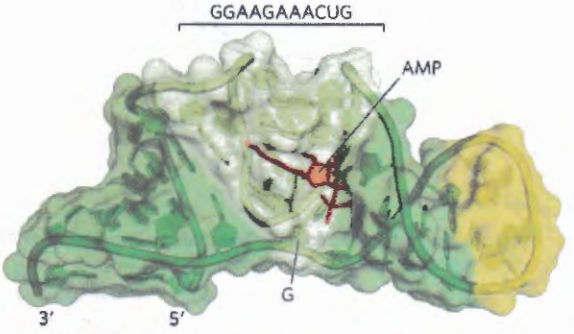


FIGURA 3 Aptámero de RNA unido a AMP. Las bases de los nucleótidos conservados (que forman la cavidad de unión), en verde pálido; el AMP unido, en rojo. [Fuente: Información extraída del PDB ID 1RAW, T. Dieckmann et al., *RNA* 2:628, 1996.]

La búsqueda de RNA con nuevas funciones catalíticas se ha visto favorecida por un método que permite examinar mezclas de RNA de secuencia al azar y aislar aquellos que poseen actividades particulares; conocido como **SELEX,** este consiste en un proceso de evolución acelerado en el tubo de ensayo (Recuadro 26-3). Se ha utilizado el SELEX para generar moléculas de RNA que se unen a aminoácidos, colorantes orgánicos, nucleótidos, cianocobalamina y otras moléculas. También se han aislado ribozimas que catalizan la formación de enlaces éster y amida, reacciones S_N2, adición de metales a las porfirinas y formación de enlaces carbono-carbono. La evolución de cofactores enzimáticos con "asas" nucleotídicas que facilitan la unión a ribozimas puede haber ampliado el repertorio de procesos químicos disponible para los sistemas metabólicos primitivos.

4. La estructura del Ribosoma Tal como veremos en el capítulo 27, algunas moléculas de RNA naturales, componentes del ribosoma, pueden catalizar la formación de enlaces peptídicos, lo cual da idea de cómo el mundo de RNA ha podido ser transformado por el mayor potencial catalítico de las proteínas. La evolución de una capacidad de sintetizar proteínas pudo ser un acontecimiento trascendental en la evolución del mundo de RNA, permitiendo la generación de polímeros que pudieran estabilizar estructuras complejas de RNA. A pesar de eso, el comienzo de la sisntesis peptídica también podría haber puesto en peligro la desaparición del mundo de RNA. Las proteínas són simplemente mejores catalizadores. El papel de portador de información del RNA puede haber sido asumido por el DNA porque el DNA es más estable químicamente. La RNA replicasa y la transcriptasa inversa pueden ser versiones modernas de enzimas que en cierto tiempo jugaron un importante papel en la transición a los sistemas modernos basados en el DNA.

5. Vestigios Existentes de un Mundo de RNA Las funciones conocidas del RNA continúan multiplicándose cada década. Los retroviruses, otras clases de virus de RNA y los retrotransposones habitan un universo medio independiente, manteniendo una vida parasítica en la biosfera. Para los biólogos evolutivos, estas entidades casi-vivas generan una ventana de los pasos imprescindibles para la evolución de la vida. Los transposones pueden haber sido una innovación temprana en un

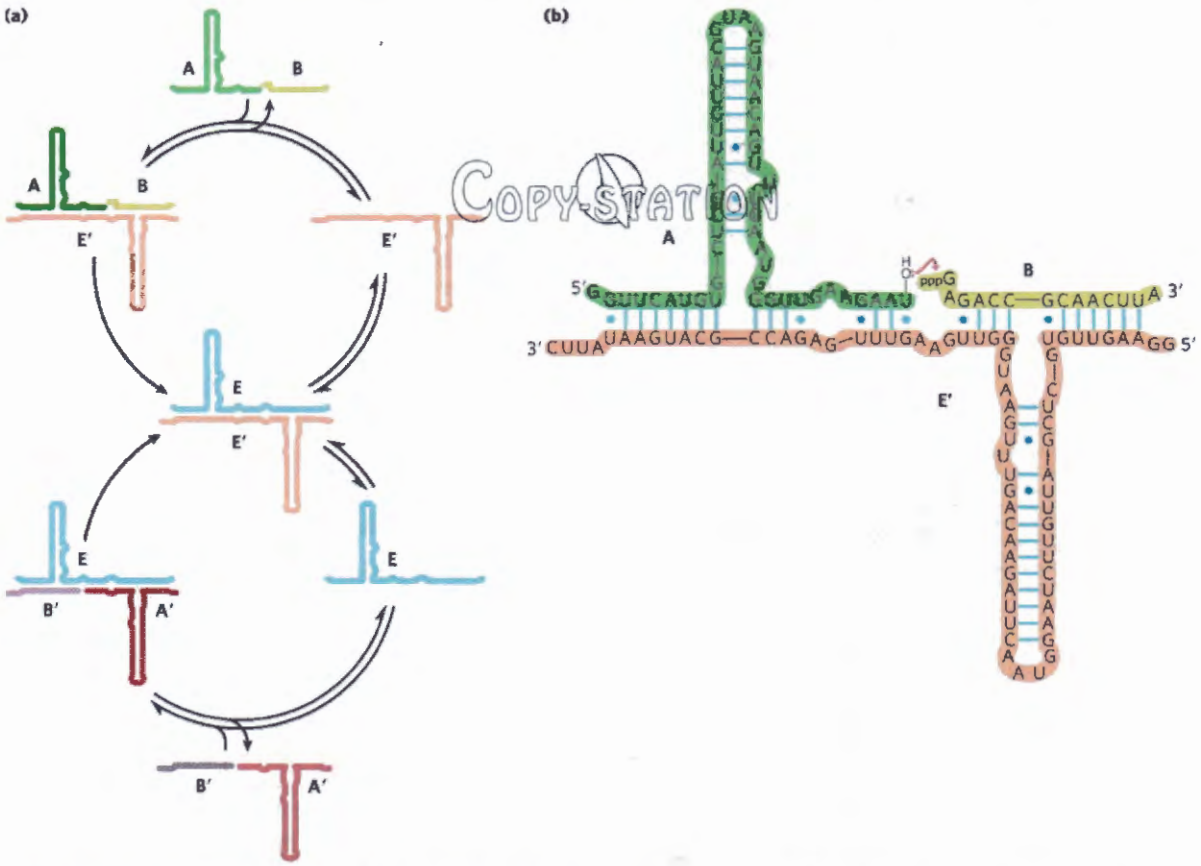


FIGURA 26-40 Replicación autoalimentada de un enzima de RNA. Este sistema tiene muchas de las propiedades de un sistema vivo. Las moléculas de RNA incorporan información y actividad catalítica y la reacción produce un aumento exponencial de los RNA producto. Cuando se introducen variantes de los sustratos de RNA, el sistema experimenta selección natural, de modo que las moléculas que mejor se replican acaban dominando la población. **(a)**. Se muestra el esquema de la reacción. Los oligorribonucleótidos A y B se aparean con el ribozima E' y se ligan catalíticamente para formar el ribozima E. La unión de los oligorribonucleótidos A' y B' es catalizada igualmente por el ribozima E. Los niveles de E y E' crecen exponencialmente, con un tiempo de duplicación de aproximadamente una hora a 42°, siempre que se mantenga el suministro de los precursores A, B, A' y B'. **(b)** La reacción de ligación implica el ataque del 3' OH de un oligorribonucleótido sobre el fosfato α del 5'-trifosfato del otro oligorribonucleótido. Se libera pirofosfato. El apareamiento de los sustratos con el ribozima es determinante en el alineamiento de los sustratos para la reacción. [Fuente: Información de T. A. Lincoln y G. F. Joyce, *Science* 323:1229, 2009]

mundo de RNA. Con la aparición de los primeros, ineficientes autoreplicativos, la transposición podría haber sido una importante alternativa a la replicación como estrategia para reproducirse con éxito y sobrevivir. Los primitivos parásitos de RNA simplemente se habrían introducido en una molécula autorreplicativa mediante una transesterificación catalizada, para luego ser replicados pasivamente. La selección natural habría convertido la transposición en específica de sitio, para no interferir con las actividades catalíticas del RNA huésped. Las secuencias autorreplicativas y los transposones podrían haber establecido una primitiva relación simbiótica, en la que cada uno habría contribuido a la evolución del otro. Los intrones modernos, los retrovirus y los transposones podrían ser vestigios de la estrategia de hacerse transportar adoptada por los primitivos RNA parásitos. Estos elementos siguen contribuyendo considerablemente a la evolución de sus huéspedes.

6. Avances en la búsqueda de un replicador de RNA La hipótesis de un mundo de RNA requiere que un polímero de nucleótidos se reproduzca a sí mismo. ¿Puede un ribozima llevar a término su propia síntesis en un modo dependiente de molde? Encontrar este ribozima o sistema de ribozimas es cada vez más próximo. Por ejemplo, Gerald Joyce y colaboradores publicaron en 2009 la existencia de dos ribozimas que podían catalizar recíprocamente su propia formación **(Fig. 26-40)**. Un ribozima, E, cataliza la unión de dos oligonucleótidos (A' y B') que crea un segundo ribozima complementario, denominado E'. E' podría catalizar a continuación la unión de otros dos oligonucleótidos (A y B) para formar otra molécula de E. En este sistema, la formación de E y E' es dependiente de molde y las cantidades crecen exponencialmente mientras los sustratos estén disponibles y las proteínas ausentes. El sistema evolucionó y aparecieron enzimas más eficientes en la población. Una RNA polimerasa más general del tipo de los ribozimas fue descrita en 2011 por Philipp Holliger y colaboradores.

Aunque el mundo de RNA sigue siendo una hipótesis con muchos aspectos todavía por explicar, las pruebas experimentales apoyan un número cada vez mayor de sus elementos fundamentales. Futuras investigaciones deberían ampliar nuestra compresión. Algunas piezas importantes del rompecabezas procederán de los estudios de la química fundamental de las células y quizás de otros planetas.

RESUMEN 26.3 Síntesis de RNA y DNA dependiente de RNA

- Las DNA polimerasas dependientes de RNA, también denominadas transcriptasas inversas, fueron descubiertas en los retrovirus, que han de convertir sus genomas de RNA en DNA de doble cadena durante su ciclo vital. Estos enzimas transcriben el RNA vírico en DNA, proceso que puede aprovecharse experimentalmente para obtener DNA complementario.
- Muchos transposones eucarióticos están relacionados con los retrovirus y su mecanismo de transposición incluye un intermedio de RNA.
- La telomerasa, el enzima que sintetiza los extremos teloméricos de los cromosomas lineales, es una transcriptasa inversa especializada que contiene un molde de RNA interno.
- Las RNA polimerasas dependientes de RNA, tales como las replicasas de los bacteriófagos de RNA, son específicas de molde para el RNA vírico.
- La existencia de RNA catalíticos y de rutas para la interconversión de RNA y DNA se encuentran entre las líneas de investigación que apoyan la hipótesis del mundo de RNA. El potencial bioquímico de los RNA puede ser explorado por SELEX, un método para la rápida selección de secuencias de RNA con propiedades catalíticas o de unión especiales.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

transcripción 1027
RNA mensajero (mRNA) 1027
RNA de transferencia (tRNA) 1027
RNA ribosómico (rRNA) 1027
transcriptoma 1027
RNA polimerasa dependiente de DNA 1028
hebra molde 1029
hebra no molde 1029
hebra codificante 1029
promotor 1030
secuencia consenso 1030
proteína receptora de cAMP (CRP) 1031
represor 1031
técnica de la huella 1032
factores de transcripción 1036
ribozimas 1039
transcrito primario 1039
corte y empalme de RNA 1039
casquete 5' 1040
espliceosoma 1042
RNA nuclear pequeño (snRNA) 1042
cola de poli(A) 1045
poliadenilato polimerasa 1045
mecanismo de corte y empalme alternativo 1046
RNA nucleolar pequeño (snoRNA) 1048
snoRNP 1048
microRNA (miRNA) 1051
secuencia guía interna 1052
exosoma 1054
polinucleótido fosforilasa 1054
transcriptasa inversa 1055
retrovirus 1055
DNA complementario (cDNA) 1057
alojamiento 1058
telomerasa 1059
lazo en T 1059
RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA replicasa) 1061
SELEX 1064

Problemas

1. RNA polimerasa (a) ¿Cuánto tardaría la RNA polimerasa de *E. coli* en sintetizar el transcrito primario de los genes de *E. coli* que codifican los enzimas del metabolismo de la lactosa (el operón *lac* de 5300 pb discutido en el Capítulo 28)? (b) ¿Qué distanci a lo largo del DNA habrá recorrido la "burbuja" formada por la RNA polimerasa en 10 segundos?

2. Corrección de errores por las RNA polimerasas Las DNA polimerasas pueden corregir errores, mientras que la capacidad de corrección de errores de las RNA polimerasas es limitada. Dado que un error de una sola base, tanto en la replicación como en la transcripción, puede conducir a un error en la síntesis de proteínas, sugiera una posible explicación biológica de esta diferencia.

3. Modificación postranscripción del RNA Anticipe los probables efectos de una mutación en la secuencia (5') AAUAAA en un transcrito de mRNA eucariótico.

4. Hebras codificantes y hebras molde El genoma de RNA del fago Qβ es la hebra que no sirve de molde, o hebra codificante, y que al introducirse en la célula actúa como un mRNA. Suponga que la RNA replicasa del fago Qβ haya sintetizado principalmente las hebras molde de RNA y que únicamente las haya incorporado a las partículas víricas en lugar de las hebras no molde. ¿Cuál sería el destino de las hebras molde al entrar en una nueva célula? ¿Qué enzima habría que incluir en estas partículas víricas con hebras molde para invadir con éxito una célula huésped?

5. Transcripción El gen que codifica el enzima β-galactosidasa de *E. coli* empieza con la secuencia ATGACCATGATTACG. ¿Cuál es la secuencia del transcrito de RNA especificado por esta parte del gen?

6. Química de la biosíntesis de los ácidos nucleicos Describa tres propiedades comunes a las reacciones catalizadas por la DNA polimerasa, la RNA polimerasa, la transcriptasa inversa y la RNA replicasa. ¿En qué se parece y en qué se diferencia la polinucleótido fosforilasa de estos enzimas?

7. Corte y empalme de RNA ¿Cuál es el número mínimo de reacciones de transesterificación necesario para cortar y empalmar un intrón en un transcrito de mRNA? ¿Por qué?

8. Maduración del RNA Si se bloquea el corte y empalme de un mRNA de una célula de un vertebrado, las reacciones de modificación del rRNA también se bloquean. Sugiera una explicación.

9. Genomas de RNA Los virus de RNA tienen genomas relativamente pequeños. Por ejemplo, los RNA monohebra de los retrovirus tienen unos 10.000 nucleótidos y el RNA de Qβ sólo tiene 4.220 nucleótidos. Dadas las propiedades de la transcriptasa inversa y de la RNA replicasa descritas en este capítulo, ¿puede sugerir una razón para que estos genomas víricos sean tan pequeños?

10. Escrutinio de RNA por SELEX El límite práctico para el número de secuencias de RNA diferentes que pueden ser examinadas en un experimento de SELEX es 10^{15}. (a) Suponga que trabaja con oligonucleótidos de 32 nucleótidos de longitud, ¿Cuántas secuencias hay en una muestra que contenga todas las secuencias posibles? (b) ¿Qué porcentaje puede ser examinado en un experimento de SELEX? (c) Suponga que quiere seleccionar una molécula de RNA que catalice la hidrólisis de un éster en particular. Apoyándose en sus conocimientos de la catálisis, proponga una estrategia de SELEX que permita seleccionar el catalizador apropiado.

11. Muerte lenta La seta mortal, *Amanita phalloides*, contiene varias substancias peligrosas, entre las que se encuentra la α-amanitina, que es mortal. Esta toxina bloquea la elongación del RNA en los consumidores del hongo, uniéndose a la RNA polimerasa II eucariótica con gran afinidad; es mortal a concentraciones de 10^{-8} M. La reacción inicial a la ingestión del hongo son trastornos gastrointestinales (causados por otras toxinas). Estos síntomas desaparecen, pero unas 48 horas más tarde sobreviene la muerte, normalmente por disfunción hepática. ¿Cuál puede ser la explicación de que la α-amanitina tarde tanto tiempo en provocar la muerte?

12. Detección de cepas de la tuberculosis resistentes a la rifampicina La rifampicina es un antibiótico importante usado para tratar la tuberculosis, así como otras enfermedades causadas por micobacterium. Algunas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, son resistentes a la rifampicina. Estas cepas se vuelven resistentes a consecuencia de mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa. La rifampicina no puede unirse a la RNA polimerasa mutante y por tanto es incapaz de bloquear la iniciación de la transcripción. Secuencias de DNA de un elevado número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la rifampicina tienen mutaciones en una región específica de 69 pb del gen *rpoB*. Una cepa con resistencia a la rifampicina bien caracterizada tiene un único par de bases alterado en *rpoB*, que da lugar a una sola sustitución aminoacídica en la subunidad β: un residuo de His que es reemplazado por un residuo de Asp.

Sobre la base de sus conocimientos de química deproteínas, sugiera una técnica que permita la detección de una cepa resistente a la rifampicina que contenga esta mutación en particular.

Sobre la base de sus conocimientos de la química de ácidos nucleicos, sugiera una técnica para identificar la forma mutante de *rpoB*.

Bioquímica en Internet

13. El gen de la ribonucleasa La ribonucleasa pancreática humana tiene 128 residuos.

(a) ¿Cuál es el número mínimo de pares de nucleótidos requerido para codificar esta proteína.

(b) El mRNA expresado en las células páncreáticas humanas fue copiado con transcriptasa inversa para crear una "genoteca" de DNA humano. La secuencia del mRNA que codifica la ribonucleasa pancreática humana fue determinada secuenciando el DNA complementario (cDNA) de esta genoteca que contenía una pauta de lectura abierta para la proteína. Utilice la base de datos NCBI (www. ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide) para encontrar la secuencia publicada de este mRNA (busque el número de acceso D26129). ¿Cuál es la longitud de este mRNA?

(c) ¿Cómo puede explicar la discrepancia entre el tamaño que calculó en (a) y la longitud real del mRNA?

Problema de análisis de datos

14. Un caso de edición de RNA El receptor del AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) es un componente importante del sistema nervioso humano. Está presente en varias formas, en diferentes neuronas, y parte de esta variabilidad es el resultado de modificaciones post-transcripción. Este problema examina la investigación sobre el mecanismo de edición de este RNA.

Un informe inicial de Sommer y colaboradores (1991) examinó la secuencia que codifica un residuo Arg clave del receptor del AMPA. La secuencia del cDNA (véase la Fig. 9-14) del receptor del AMPA mostró un codón CGG (Arg; véase la Fig. 27-7) para este aminoácido. Sorprendentemente, el DNA genómico mostró un codón CAG (Gln) en esta posición.

(a) Explique por qué este resultado está de acuerdo con la modificación post-transcripción del mRNA del receptor del AMPA.

Rueter y colaboradores (1995) exploraron este mecanismo en detalle. Primero desarrollaron un ensayo para distinguir entre trancritos editados y no editados, basado en el método de Sanger para secuenciar DNA (véase la Fig. 8-33). Modificaron la técnica para determinar si la base en cuestión

Copy Station

era o no una A (como en CAG). Diseñaron dos cebadores de DNA basados en la secuencia genómica de esta región del gen del AMPA. Estos cebadores y la secuencia de la hebra no molde del DNA genómico de la región de interés del gen del receptor del AMPA se muestran al final de la página; el residuo de A editado se muestra en rojo.

Para detectar si esta A estaba presente o había sido sustituida por otra base, Rueter y colaboradores utilizaron el siguiente procedimiento:

1. Prepararon cDNA complementario del mRNA, utilizando el cebador 1, transcriptasa inversa, dATP, dGTP, dCTP y dTTP.
2. Eliminaron el mRNA.
3. Hibridaron el cebador 2 marcado con ^{32}P con el cDNA y añadieron DNA polimerasa, dGTP, dCTP, dTTP y ddATP (didesoxi ATP; véase la Fig. 8-33).
4. Desnaturalizaron los dúplex resultantes y los separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (véase la Fig. 3-18).
5. Detectaron las especies de DNA marcadas con ^{32}P por autorradiografía.

Encontraron que el mRNA editado producía un [^{32}P]DNA de 22 nucleótidos, mientras que el mRNA no editado producía un [^{32}P]DNA de 19 nucleótidos.

(b) Utilizando las secuencias abajo indicadas, explique de qué modo los RNA editados y no editados dieron lugar a estos diferentes productos.

Utilizando el mismo procedimiento, esta vez para medir la fracción de transcritos editados en diferentes condiciones, los investigadores encontraron que extractos de células epiteliales cultivadas (una línea celular común denominada HeLa) podían editar el mRNA con elevada eficiencia. Para determinar la naturaleza de la maquinaria de edición trataron previamente un extracto activo de HeLa tal como se describe en la siguiente tabla y midieron su capacidad para editar el mRNA de AMPA. La proteinasa K degrada proteínas solamente; la nucleasa micrococal, solamente DNA.

Muestra	Pretratamiento	% de mRNA editado
1	Ninguno	18
2	Proteinasa K	5
3	Calor hasta 65 °C	3
4	Calor hasta 85 °C	3
5	Nucleasa micrococal	17

(c) Utilice estos datos para argumentar que la maquinaria de edición está compuesta de proteína. ¿Cuál es la debilidad de este argumento?

Para determinar la naturaleza exacta de la base editada, Rueter y colaboradores utilizaron el siguiente procedimiento:

1. Sintetizaron mRNA, usando [α-^{32}P]ATP en la mezcla de reacción.
2. Editaron el mRNA marcado incubándolo con el extracto de HeLa.
3. Hidrolizaron el mRNA editado con nucleasa P1 para producir nucleótidos monofosfato individuales .
4. Separaron los nucleótidos monofosfato por cromatografía en capa fina (TLC; véase la Fig. 10-25b).
5. Identificaron los nucleótidos monofosfato marcados con ^{32}P resultantes por autorradiografía.

En el mRNA no editado encontraron solamente [^{32}P]AMP; en el mRNA editado encontraron sobre todo [^{32}P]AMP y algo de [^{32}P]IMP (inosina monofosfato; véase la Fig. 22-36).

(d) ATP en este experimento?

(e) ¿Por qué fue necesario utilizar [α-^{32}P]ATP en lugar de [α-^{32}P]GTP, [α-^{32}P]CTP o [α-^{32}P]UTP?

(f) ¿Cómo puede excluirse la posibilidad que el nucleótido A entero (azúcar, base y fosfato) fuese eliminado y reemplazado por un nucleótido de I durante el proceso de edición?

A continuación los investigadores editaron mRNA que fue marcado con [2,8-^{3}H]ATP y repitieron el procedimiento anterior. Los únicos mononucleótidos marcados con ^{3}H fueron AMP e IMP.

(g) ¿Por qué este resultado excluye la eliminación de la base A (dejando la cadena azúcar-fosfato intacta) seguida del reemplazamiento con una base I como mecanismo de edición? ¿Cuál es pues en este caso el mecanismo más probable de edición?

(h) ¿Por qué el cambio de un residuo A por un residuo I en el mRNA explica el cambio de Gln a Arg en la secuencia proteica en las dos formas del receptor del AMPA? (sugerencia: véase la Fig. 27-8)

CopyStation

Referencias

Rueter, S.M., C.M. Burns, S.A. Coode, P. Mookherjee, and R.B. Emeson. 1995. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 267:1491–1494.

Sommer, B., M. Köhler, R. Sprengel, and P.H. Seeburg. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11–19.

(5′) ...GTCTCTGGTTTTCCTTGGGTGCCTTTATGCAGCAAGGATGCGATATTTCGCCAAG...
Cebador 1: CGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5′)
Cebador 2: (5′)CCTTGGGTGCCTTTA

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 27

Metabolismo de las proteínas

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

27.1 El código genético 1069

27.2 Síntesis de proteínas 1080

27.3 Destino y degradación de las proteínas 1105

Las proteínas son los productos finales de la mayoría de las rutas de la información. Cualquier célula necesita en cada instante miles de proteínas diferentes. Estas proteínas han de ser sintetizadas en respuesta a las necesidades celulares del momento, transportadas (dirigidas) hasta la localización celular adecuada y degradadas cuando ya no son necesarias. Muchos de los componentes fundamentales y de los mecanismos utilizados por la maquinaria de la síntesis proteica están notablemente bien conservados en todas las formas de vida desde las bacterias hasta los eucariotas superiores, lo que demuestra que se encontraban en el último antepasado común universal (LUCA) de todos los organismos actualmente existentes.

La comprensión de la síntesis proteica, el más complejo de los mecanismos biosintéticos, ha sido uno de los mayores retos de la historia de la bioquímica. En las células eucariotas, la síntesis proteica requiere la participación de más de 70 proteínas ribosómicas diferentes; 20 o más enzimas para activar los aminoácidos precursores, una docena o más de enzimas auxiliares y otros factores específicos para el inicio, la elongación y la terminación de los polipéptidos; unos 100 enzimas adicionales para la modificación de las diferentes clases de proteínas y 40 o más clases de RNA ribosómico y de transferencia. En total, casi 300 macromoléculas diferentes han de cooperar para sintetizar los polipéptidos. Muchas de estas macromoléculas están entre las más abundantes que se encuentran en cualquier célula. Algunas de ellas forman parte de la compleja estructura tridimensional de los ribosomas.

Para apreciar en su justa medida la importancia de la síntesis proteica, conviene considerar los recursos celulares dedicados a este proceso. La síntesis proteica consume hasta el 90% de la energía química utilizada por la célula en todas las reacciones biosintéticas. Cada célula bacteriana, arquea o eucariótica contiene desde unas cuantas hasta millares de copias de cada tipo de proteína y de RNA. Los 15.000 ribosomas, los 100.000 factores proteicos y enzimáticos relacionados con la síntesis de proteínas y las 200.000 moléculas de tRNA presentes en una célula bacteriana típica representan más del 35% del peso seco celular.

A pesar de esta gran complejidad, de la síntesis de proteínas, las proteínas se fabrican a velocidades vertiginosas. Una cadena polipeptídica completa de 100 residuos se sintetiza en una célula de *E. coli* (a 37 °C) en aproximadamente 5 segundos. La síntesis de los millares de proteínas diferentes de una célula está estrechamente regulada para que sólo se fabrique la cantidad necesaria en las condiciones metabólicas imperantes. Para mantener la mezcla apropiada y la concentración adecuada de proteínas, los procesos de direccionamiento y degradación deben estar coordinados con la síntesis. La investigación está desvelando gradualmente el conjunto de procesos celulares que dirigen cada proteína hasta su localización celular correcta y que degradan selectivamente las proteínas cuando ya no son necesarias.



Harry Noller
[Fuente: Cortesía de Harry Noller.]

El estudio de la síntesis proteica ofrece otra importante recompensa: un panorama sobre el mundo de los catalizadores de RNA que pueden haber existido antes del establecimiento de la vida "tal como la conocemos". La determinación de la estructura tridimensional de los cromosomas bacterianos, iniciada el año 2000, ha mostrado el funcionamiento de la síntesis proteica con gran detalle molecular. También ha confirmado una hipótesis formulada por primera vez por Harry Noller dos décadas antes: las proteínas son sintetizadas por un gigantesco enzima de RNA

27.1 El código genético

Tres importantes descubrimientos allanaron el camino hasta el conocimiento presente de la síntesis proteica. A principios de los años 1950, Paul Zamecnik y colaboradores diseñaron diversos experimentos para investigar

en qué lugar de la célula se sintetizaban las proteínas. Inyectaron aminoácidos radiactivos a ratas y se extrajeron los hígados, se homogenizaron y fraccionaron por centrifugación a diferentes intervalos después de la inyección. Seguidamente, se analizaron las proteínas radiactivas en las fracciones subcelulares. Cuando se dejaban pasar horas o días después de la inyección de los aminoácidos marcados *todas* las fracciones subcelulares contenían proteínas marcadas. No obstante, cuando habían transcurrido escasamente unos minutos sólo se encontraba proteína marcada en la fracción que contenía partículas pequeñas de ribonucleoproteína. Estas partículas, visibles en los tejidos animales por microscopía electrónica, se identificaron, por tanto, como el sitio de la síntesis proteica a partir de aminoácidos y más tarde se las llamó ribosomas **(Fig. 27-1)**.



Paul Zamecnik, 1912–2009 [Fuente: Archives and Special Collections, Massachusetts General Hospital.]

El segundo descubrimiento clave fue realizado por Mahlon Hoagland y Zamecnik, que encontraron que los aminoácidos eran "activados" cuando se incubaban con ATP y la fracción citosólica del hígado. Los aminoácidos se unían a una forma especial de RNA soluble y termoestable, caracterizada por Robert Holley, llamada más tarde RNA de transferencia (tRNA), formando **aminoacil-tRNA**. Los enzimas que catalizan este proceso son las **aminoacil-tRNA sintetasas**.

El tercer descubrimiento importante tuvo lugar cuando Francis Crick se preguntó de qué modo la información genética contenida en el lenguaje de 4 letras de los ácidos nucleicos podía traducirse al lenguaje de 20 letras de las proteínas. Crick propuso que un pequeño ácido nucleico (tal vez RNA) podría desempeñar el papel de adaptador; una parte de la molécula de adaptador se uniría a un aminoácido específico mientras que otra parte del adaptador reconocería la secuencia nucleotídica que codificara dicho aminoácido en el mRNA **(Fig. 27-2)**. Esta idea pronto fue confirmada. El tRNA adaptador "traduce" la secuencia nucleotídica de un mRNA a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. El proceso global de síntesis de proteínas guiada por mRNA muy a menudo se denomina simplemente **traducción**.

Estos tres avances pronto condujeron a la identificación de las principales fases de la síntesis de proteínas y finalmente a la elucidación del código genético que especifica cada uno de los aminoácidos.

El código genético fue descifrado mediante moldes de mRNA artificiales

En la década de 1960 estaba claro que se requerían al menos tres residuos nucleóticos del DNA para codificar cada aminoácido. El código de cuatro letras del DNA (A, T, G y C) en grupos de dos sólo puede dar $4^2 = 16$ combinaciones diferentes, que no son suficientes para codificar los 20 aminoácidos. No obstante, cuatro bases en grupos de tres pueden dar $4^3 = 64$ combinaciones diferentes.

COPY-STATION

Algunas de las características esenciales del código genético fueron rápidamente establecidas mediante experimentos genéticos **(Figs. 27-3, 27-4)**. Un **codón** es un triplete de nucleótidos que codifica un aminoácido específico. La traducción tiene lugar de manera que los tripletes son leídos sucesivamente y sin solapamiento. Un primer codón específico en la secuencia determina el **marco de lectura**, en el que un nuevo codón

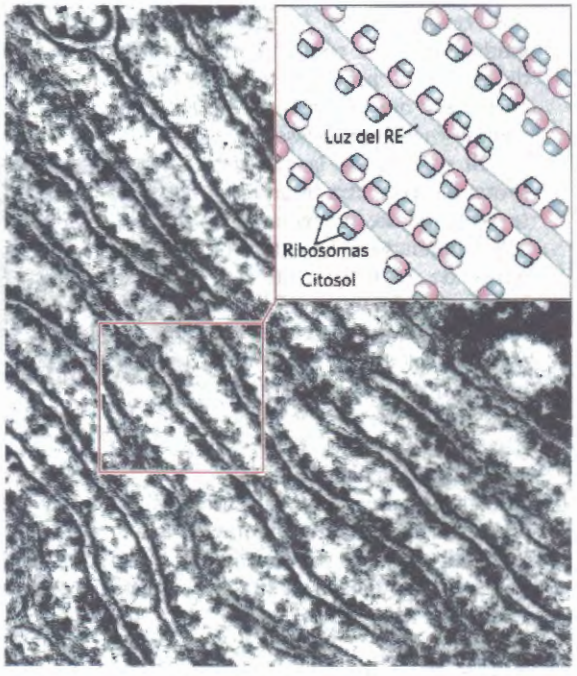


FIGURA 27-1 Ribosomas y retículo endoplasmático. La micrografía electrónica y el dibujo esquemático de una porción de célula pancreática muestran ribosomas unidos a la cara externa (citosólica) del retículo endoplasmático (RE). Los ribosomas son los numerosos pequeños puntos en el borde de las capas de membranas paralelas. (Fuente: Joseph F. Gennaro Jr/ Fuente científica)

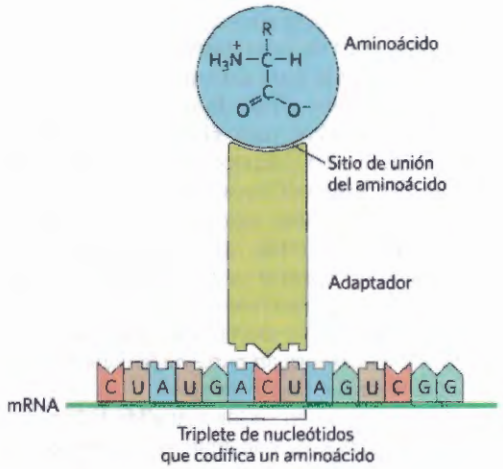


FIGURA 27-2 Hipótesis del adaptador de Crick. Actualmente sabemos que el aminoácido está unido covalentemente al extremo 3' de la molécula de tRNA y que un triplete de nucleótidos específico en otra parte de la molécula de tRNA interacciona con un triplete específico en el mRNA mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias.



FIGURA 27-3 Un código con solapamiento frente a un código sin solapamiento. En un código sin solapamiento los codones (numerados de forma consecutiva) no comparten nucleótidos. En un código con solapamiento, algunos nucleótidos del mRNA son compartidos por codones diferentes. En un código de tripletes con solapamiento máximo, muchos nucleótidos como el tercer nucleótido (A) de la izquierda, son compartidos por tres codones. Obsérvese que en un código con solapamiento, la secuencia del primer codón limita las posibles secuencias del segundo codón. Un código sin solapamiento da mucha más flexibilidad en la secuencia de tripletes de los codones vecinos y, por tanto, en las posibles secuencias de aminoácidos especificadas por el código. El código genético utilizado en todos los sistemas vivos es sin solapamiento.

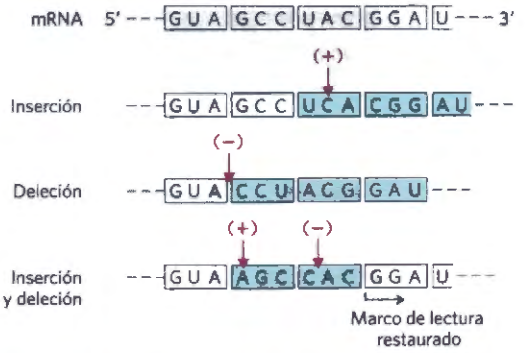


FIGURA 27-4 Código de tripletes no solapados. Los datos sobre la naturaleza del código genético se obtuvieron a partir de muchos tipos de experimentos, entre ellos experimentos genéticos sobre los efectos de mutaciones por deleción e inserción. La inserción o deleción de un par de bases (mostrada aquí en el transcrito de mRNA) altera la secuencia de tripletes en un código sin solapamiento; todos los aminoácidos codificados por el mRNA después del cambio quedan afectados. La combinación de mutaciones por inserción y deleción afecta algunos aminoácidos, pero finalmente puede restaurar la secuencia correcta de aminoácidos. La adición o sustracción de tres nucleótidos (no mostrada) deja intactos los restantes tripletes, lo que demuestra que un codón tiene tres nucleótidos, y no cuatro o cinco. Los codones de tripletes sombreados en gris son los transcritos a partir del gen original; los codones sombreados en azul son codones nuevos resultantes de mutaciones por inserción o deleción.

empieza cada tres nucleótidos. No hay puntuación entre los codones de sucesivos aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de una proteína está definida, por tanto, por una secuencia lineal de tripletes contiguos. En principio, cualquier secuencia de DNA de cadena sencilla o de mRNA tiene tres posibles marcos de lectura. Cada marco de lectura da una secuencia diferente de codones **(Fig. 27-5)**, pero sólo una es probable que codifique una proteína determinada. Todavía quedaba una pregunta fundamental por responder. ¿Cuáles eran las palabras de tres letras para cada aminoácido?

COPY-STATION

En 1961 Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei realizaron el primer avance significativo. Incubaron poliuridilato sintético, poli(U), con un extracto de *E. coli*, GTP, ATP y una mezcla de los 20 aminoácidos en 20 tubos diferentes, cada tubo con un aminoácido diferente marcado con radioactividad. Puesto que el mRNA poli(U) está formado por muchos tripletes UUU sucesivos, debería promover la síntesis de un polipéptido que contuviera solamente el aminoácido codificado por el triplete UUU. En efecto, se formó un polipéptido radiactivo sólo en uno de los 20 tubos, el que contenía fenilalanina radiactiva. Nirenberg y Matthaei concluyeron, por tanto, que el triplete UUU codifica la fenilalanina. El mismo método demostró que el polinucleótido sintético policitidilato o poli(C) codifica un polipéptido que sólo contiene prolina (polipro-



Marshall Nirenberg, 1927–2010 [Fuente: AP Photo.]

lina), mientras que el poliadenilato, poli(A), codifica la polilisina. El poliguanilato no generó ningún polipéptido porque forma espontáneamente tetraplexos (véase la Fig. 8-20d) que no pueden unirse a los ribosomas.

Los polinucleótidos sintéticos utilizados en estos experimentos se obtuvieron con la polinucleótido fosforilasa, que cataliza la formación de polímeros de RNA a partir de ADP, UDP, CDP y GDP. Este enzima, descubierto por Severo Ochoa, no requiere molde y fabrica polímeros con una composición de bases que refleja directamente la concentración relativa de los precursores nucleósido 5'-difosfato del medio. Si a la polinucleótido fosforilasa se le suministra sólo UDP, fabrica poli(U). Si se le suministra una mezcla de cinco partes de ADP y una de CDP, fabricará un polímero con cinco sextos de adenilato y un sexto de citidilato. Un polímero al azar de este tipo es probable que contenga muchos tripletes con la secuencia AAA, un número menor de AAC, ACA y CAA, relativamente pocos ACC, CCA y CAC y muy pocos tripletes CCC (Tabla 27-1). Con la utilización de diferentes mRNA artificiales producidos por la polinucleótido fosforilasa a partir de mezclas de partida diferentes de ADP, GDP, UDP y CDP, los grupos de Nirenberg y Ochoa pronto identificaron la composición de bases de los tripletes que codifican la casi tota-

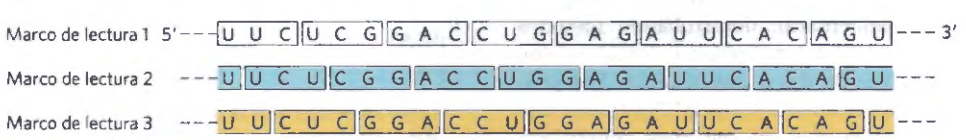


FIGURA 27-5 Marcos de lectura en el código genético. En un código de tripletes sin solapamiento, todos los mRNA tienen tres pautas de lectura potenciales, mostradas en diferentes colores. Obsérvese que los tripletes y, por tanto, los aminoácidos especificados, son diferentes en cada marco de lectura.

TABLA 27-1 Incorporación de aminoácidos en polipéptidos en respuesta a polímeros aleatorios de RNA

Aminoácido	Frecuencia de incorporación observada (Lys=100)	Asignación tentativa de la composición de nucleótidos del codón correspondiente*	Frecuencia de incorporación esperada basada en la asignación (Lys=100)
Asparagina	24	A_2C	20
Glutamina	24	A_2C	20
Histidina	6	AC_2	4
Lisina	100	AAA	100
Prolina	7	AC_2, CCC	4,8
Treonina	26	A_2C, AC_2	24

Nota: Aquí se presenta un resumen de los datos de uno de los primeros experimentos diseñados para dilucidar el código genético. Se utilizó un RNA sintético, que sólo contenía residuos A y C en la proporción 5:1, para dirigir la síntesis del polipéptido. Se determinaron tanto la identidad como la cantidad de aminoácidos incorporados. Basándose en la abundancia relativa de residuos A y C en el RNA sintético y asignando al codón AAA (el más probable) una frecuencia de 100, debería haber tres codones de composición A_2C, cada uno con una frecuencia relativa de 20; tres codones de composición AC_2, cada uno con una frecuencia relativa de 4,0; y el codón CCC con una frecuencia relativa de 0,8. La asignación del CCC se basó en la información obtenida en estudios anteriores con poli(C). Cuando se hacen dos asignaciones tentativas de codón, se propone que ambos codifican el mismo aminoácido.

*Estas designaciones de composición de nucleótidos no contienen información sobre la secuencia nucleotídica (excepto, claro está, en los casos de AAA y CCC).

lidad de los aminoácidos. Aunque estos experimentos revelaron la composición de bases de los tripletes codificantes, en general no pudieron desvelar su secuencia de bases.

» Convención clave: El contenido del capítulo trata en gran parte de los tRNA. El aminoácido especificado por un tRNA se indica con un superíndice, tal como $tRNA^{Ala}$ y el tRNA aminoacilado con un nombre con un guión: alanil-$tRNA^{Ala}$ o Ala-$tRNA^{Ala}$. **«**

En 1964 Nirenberg y Philip Leder lograron otro avance fundamental. Encontraron que los ribosomas aislados de *E. coli* fijaban un aminoacil-tRNA específico en presencia del correspondiente polinucleótido mensajero sintético. Por ejemplo, ribosomas incubados con poli(U) y fenilalanil-$tRNA^{Phe}$ (o Phe-$tRNA^{Phe}$) fijan ambos RNA, pero si los ribosomas se incuban con poli(U) y algún otro aminoacil-tRNA, el aminoacil-tRNA no se fija porque no reconoce los tripletes UUU del poli(U) (Tabla 27-2). Incluso los trinucleótidos permitían la unión específica de los tRNA apropiados, por lo que estos experimentos pudieron realizarse con oligonucleótidos sintetizados químicamente. De esta forma fue posible determinar qué aminoacil-tRNA se fijaba a 54 de los 64 codones de tripletes posibles. Con algunos codones, o no se fijaba ningún aminoacil-tRNA o se fijaba más de uno. Se necesitaba otro método para completar y confirmar el código genético en su totalidad.

Contemporáneamente, H. Gobind Khorana aportó un enfoque complementario, desarrollando métodos que permitían sintetizar polirribonucleótidos con secuencias repetitivas de dos a cuatro bases. Los polipéptidos producidos utilizando estos mRNA tenían uno o unos pocos aminoácidos en patrones repetitivos. Estos patrones, combinados con la información obtenida a partir de los polímeros al azar utilizados por Nirenberg y colaboradores, permitieron la asignación de codones sin ambigüedades. El polímero $(AC)_n$, por ejemplo, tiene codones ACA y CAC alternantes: ACACACACACACACA. El polipéptido sintetizado con este mensajero contenía cantidades iguales de treonina y de histidina. Dado que el codón de la histidina tiene una A y dos C (Tabla 27-1), CAC debe codificar la histidina y ACA la treonina.



H. Gobind Khorana, 1922-2011 [Fuente: Cortesía de Archives, University of Wisconsin-Madison.]

Los resultados de muchos experimentos permitieron la asignación de 61 de los 64 codones posibles. Los otros tres se identificaron como codones de terminación, en parte porque destruían los patrones de codificación de aminoácidos cuando esta-

TABLA 27-2 Trinucleótidos que inducen unión específica de aminoacil-tRNA a los ribosomas

Trinucleótido	Aumento relativo de aminoacil-tRNA marcado con ^{14}C unido al ribosoma*		
	Phe-$tRNA^{Phe}$	Lys-$tRNA^{Lys}$	Pro-$tRNA^{Pro}$
UUU	4,6	0	0
AAA	0	7,7	0
CCC	0	0	3,1

Fuente: Information from M. Nirenberg y P. Leder, *Science* 145:1399, 1964.

*Los números representan el factor en que aumentaba la cantidad de ^{14}C unido cuando se hallaba presente el trinucleótido indicado, en relación con el control al cual no se había añadido el trinucleótido.

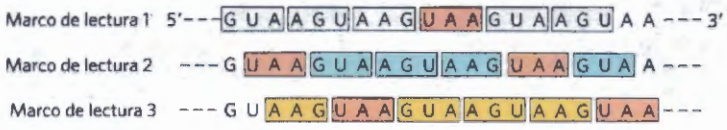


FIGURA 27-6 Efecto de un codón de terminación en un tetranucleótido repetido. Los codones de terminación (en rosa) se encuentran cada cuarto codón en los tres diferentes marcos de lectura (mostrados en diferentes colores). Se sintetizan dipéptidos o tripéptidos según el sitio en donde se una inicialmente el ribosoma.

ban presentes en los polímeros de RNA sintético **(Fig. 27-6)**. El significado de todos los tripletes (tabulado en la **Fig. 27-7**) fue establecido ya en 1966 y ha sido verificado de muchas formas distintas. El descifrado del código genético está considerado como uno de los mayores descubrimientos científicos del siglo XX.

Los codones son la clave de la traducción de la información genética, que hace posible la síntesis de proteínas específicas. El marco de lectura se establece cuando empieza la traducción de una molécula de mRNA y se mantiene mientras la maquinaria de síntesis lea secuencialmente un triplete tras otro. Si el marco de lectura inicial se desplaza una o dos bases o si la traducción pasa por alto un nucleótido en el mRNA, todos los codones siguientes estarán fuera de registro; el resultado es una proteína "sin sentido" con una secuencia de aminoácidos alterada.

Varios codones tienen funciones especiales (Fig. 27-7). El **codón de inicio** AUG es la señal más común del principio de las cadenas polipeptídica en todas las células, además de codificar residuos Met en posiciones internas de los polipéptidos. Los **codones de terminación** (UAA, UAG y UGA), también llamados codones de paro o codones sin sentido, normalmente señalan el final de la síntesis de un polipéptido y no codifican ninguno de los aminoácidos conocidos. Algunas excepciones a estas reglas se discuten en el Recuadro 27-1.

Como se describe en la Sección 27.2, el inicio de la síntesis proteica en la célula es un proceso elaborado que requiere un codón de inicio y otras señales en el mRNA. Desde la perspectiva actual, los experimentos de Nirenberg, Khorana y otros para identificar la función de los codones no debieran haber funcionado en ausencia de codones de inicio. Afortunadamente, las condiciones experimentales hicieron que los requerimientos normales para el inicio de la síntesis proteica estuviesen relajados. Una vez más en la historia de la bioquímica, el esfuerzo combinado con la buena suerte produjo un avance importante.

En una secuencia de nucleótidos al azar, uno de cada 20 codones de cada marco de lectura, es, como promedio, un codón de terminación. En general, un marco de lectura sin un codón de terminación en 50 o más codones, se denomina **marco de lectura abierto (ORF)**. Los marcos de lectura abiertos largos normalmente corresponden a genes que codifican proteínas. En el análisis de las secuencias presentes en los bancos de datos, se utilizan programas sofisticados que buscan marcos de lectura abiertos con el fin de encontrar genes entre la enorme cantidad de DNA no génico. Un gen ininterrumpido que codificara una proteína típica de masa molecular 60.000 requeriría un marco de lectura abierto con 500 codones o más.

Una característica destacable del código genético consiste en que un aminoácido determinado puede ser especificado por más de un codón por lo que el código se califica como **degenerado**. Ello *no* significa que el código sea imperfecto: aunque un aminoácido puede tener dos o más codones cada codón especifica un único aminoácido. La degeneración del código no es uniforme. Mientras que la metionina y el triptófano tienen un solo codón, tres aminoácidos (Arg, Leu, Ser) tienen seis codones, cinco aminoácidos tienen cuatro, la isoleucina tiene tres y nueve aminoácidos tienen dos (Tabla 27-3).

El código genético es casi universal. Con la intrigante excepción de pequeñas variaciones en las mitocondrias, algunas bacterias y algunos eucariotas unicelulares (Recuadro 27-1), los codones de los aminoácidos son idénticos en todas las especies examinadas hasta ahora. Los seres humanos, *E. coli*, las plantas del tabaco, los anfibios y los virus comparten el mismo código genético. Ello indica que todas las formas de vida tienen un antepasado común, cuyo código genético ha sido preservado a lo largo de toda la evolución biológica. Incluso las variaciones refuerzan esta conclusión.

Primera letra del codón (extremo 5')

Segunda letra del codón →

	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

FIGURA 27-7 "Diccionario" de las palabras del código de los aminoácidos en los mRNA. Los codones están escritos en la dirección 5'→3'. La tercera base de cada codón (en negrita) juega un papel menos importante en la especificación del aminoácido que las dos primeras. Los tres codones de terminación se indican en rojo y el codón de inicio AUG en verde. Todos los aminoácidos, excepto la metionina y el triptófano, tienen más de un codón. En la mayoría de casos, los codones que especifican el mismo aminoácido sólo difieren en la tercera base.

RECUADRO 27-1 Excepciones que confirman la regla: variaciones naturales del código genético

En bioquímica, como en otras disciplinas, las excepciones a las reglas generales pueden ser problemáticas para los profesores y frustrantes para los estudiantes. Sin embargo, al mismo tiempo nos enseñan que la vida es compleja y nos estimulan en la búsqueda de más sorpresas. Entender las excepciones puede incluso reforzar la regla original de maneras a veces sorprendentes.

Podría parecer que queda poco margen de maniobra para cambios en el código genético. Incluso la sustitución de un solo aminoácido puede tener efectos profundamente negativos sobre la estructura de una proteína. Sin embargo, en algunos organismos se encuentran variaciones en el código que son a la vez interesantes e instructivas. La misma rareza y los tipos de estas variaciones aportan pruebas poderosas a favor de un origen evolutivo común de todos los seres vivos.

Para alterar el código se han de producir cambios en uno o varios genes que codifican tRNA, siendo el anticodón la diana obvia de las modificaciones. Un cambio de estas características implicaría la inserción sistemática de un aminoácido en un codón que no especifica este aminoácido según el código normal (véase la Fig. 27-7). El código genético está definido, en efecto, por dos elementos: (1) los anticodones de los tRNA (que determinan en qué lugar se coloca un aminoácido en un polipéptido en formación) y (2) la especificidad de los enzimas, las aminoacil-tRNA sintetasas, que cargan los tRNA y deciden la identidad del aminoácido unido a un determinado tRNA.

Debido a los efectos catastróficos que la mayoría de cambios súbitos del código tendrían sobre las proteínas celulares, es de suponer que las alteraciones del código sólo tengan lugar en casos que afecten a relativamente pocas proteínas. Esto podría suceder en genomas pequeños que codifiquen sólo unas pocas proteínas. Las consecuencias biológicas de un cambio de código se podrían limitar también restringiendo los cambios a los tres codones de terminación, ya que, generalmente, no aparecen *dentro* de los genes (véase el Recuadro 27-3 para excepciones a *esta* regla). Efectivamente, se ha observado este patrón.

La mayor parte de las muy escasas variaciones conocidas del código genético ocurren en el DNA mitocondrial (mtDNA), que sólo codifica entre 10 y 20 proteínas. Las mitocondrias tienen sus propios tRNA, por tanto, sus variaciones en el código no afectan a los genomas celulares. Los cambios más comunes en las mitocondrias afectan a los codones de terminación, Estos cambios sólo afectan la terminación de los productos de un subconjunto de genes, y a veces los efectos sobre estos genes tienen poca entidad porque los genes tienen múltiples (redundantes) codones de terminación.

Los mtDNA de los vertebrados tienen genes que codifican 13 proteínas, dos rRNA y 22 tRNA (véase la Fig. 19-40a). El pequeño número de reasignaciones de codones, junto con un conjunto de reglas de balanceo poco comunes, permite que los 22 tRNA puedan descodificar los genes de las proteínas, en lugar de los 32 tRNA requeridos por el código normal. En las mitocondrias, estos cambios pueden ser contemplados como una forma de mejorar la eficiencia genómica, pues un genoma más pequeño confiere una ventaja replicativa al orgánulo. Cuatro familias de codones (en las que el aminoácido está determinado enteramente por los dos primeros nucleótidos) son descodificados por un único tRNA con un residuo U en la primera posición (de balanceo) del anticodón. O bien la U se aparea de alguna forma con las cuatro bases posibles en la tercera posición del codón, o bien no se necesita apareamiento en la tercera posición del codón. Otros tRNA reconocen codones con A o G en la tercera posición, mientras que otros reconocen U o C, de modo que prácticamente todos los tRNA reconocen dos o cuatro codones.

En el código normal sólo la metionina y el triptófano son especificados por codones únicos (véase la Tabla 27-3). Si todos los tRNA mitocondriales reconocen dos codones, sería de esperar la existencia de codones adicionales para Met y Trp en las mitocondrias. Y así observamos que la variación más comúnmente observada en el código sea que UGA no especifique terminación sino Trp. El $tRNA^{Trp}$ reconoce e inserta un residuo de Trp, tanto en el codón de terminación UGA como en el codón normal del Trp, UGG. La segunda variación más frecuente es la conversión del codón AUA de la Ile en un codón de Met; el codón normal de la Met es AUG y un único tRNA puede reconocer ambos codones. Las variaciones conocidas del código de las mitocondrias se muestran en la Tabla 1.

Pasando a los cambios mucho más raros en los códigos de genomas celulares (en contraposición con los mitocondriales), la única variación conocida en una bacteria es, de nuevo, la utilización de UGA para codificar residuos Trp, encontrada en la célula más sencilla capaz de vida libre, *Mycoplasma capricolum*. En los eucariotas, los únicos cambios de codificación extramitocondriales conocidos tienen lugar en unas pocas especies de protistas ciliados, en los cuales los dos codones de terminación UAA y UAG especifican glutamina. También hay algunos casos, raros pero interesantes, de codones de terminación que se han adaptado para codificar aminoácidos no pertenecientes a los 20 estándar tal como se detalla en el Recuadro 27-2.

Los cambios en el código no tienen por qué ser absolutos; un codón no tiene por qué codificar siempre el mismo aminoácido. Por ejemplo, en muchas

TABLA 1 Asignaciones de las variantes conocidas del código mitocondrial

	Codones*				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
Asignaciones del código normal	Stop	Ile	Arg	Leu	Arg
Animales					
Vertebrados	Trp	Met	Stop	+	+
Drosophila	Trp	Met	Ser	+	+
Levaduras					
Saccharomyces cerevisiae	Trp	Met	+	Thr	+
Torulopsis glabrata	Trp	Met	+	Thr	?
Schizosaccharomyces pombe	Trp	+	+	+	+
Hongos filamentosos	Trp	+	+	+	+
Tripanosomas	Trp	+	+	+	+
Plantas superiores	+	+	+	+	Trp
Chlamydomonas reinhardtii	?	+	+	+	?

* N indica cualquier nucleótido; +, el codón tiene el mismo significado que en el código normal; ? codón no observado en este genoma mitocondrial.

bacterias, incluida *E. coli*, GUG (Val) se utiliza en ocasiones como codón de inicio que especifica Met. Esto sucede solamente en los genes en los que el GUG está situado adecuadamente en relación a determinadas secuencias del mRNA que afectan el inicio de la traducción (tal como se discute en la Sección 27.2).

La alteración más sorprendente del código genético se encuentra en algunas especies de hongos del género *Candida*, originalmente descubierta en *Candida albicans*. *C albicans* es un organismo de gran complejidad genómica, lo que no ha impedido que su código genético experimentase un profundo cambio: el codón CUG, que normalmente codifica Leu, en su lugar codifica Ser. La presión natural selectiva a favor de este cambio es completamente desconocida. Además, la naturaleza química de la Ser y la Leu es completamente diferente. Sin embargo, incluso este cambio puede entenderse a partir de las características del código universal. Cuando varios codones codifican el mismo aminácido y utilizan múltiples tRNA, no todos los codones se utilizan con igual frecuencia. Como consecuencia de un fenómeno denominado **preferencia codónica**, algunos codones de un aminoácido determinado se usan más frecuentemente (a veces mucho más frecuentemente) que otros. Los tRNA para los codones usados frecuentemente están presentes a menudo a concentraciones mucho más altas que los tRNA requeridos por los codones raramente utilizados. La degeneración del código implica la presencia de seis codones para la Leu. En las bacterias, CUG se usa a menudo para codificar Leu. Sin embargo, en hongos de géneros estrechamente relacionados con *Candida*, pero carentes del cambio de codificación, el codón CUG se usa muy raramente para codificar Leu y a menudo se encuentra completamente ausente en las proteínas altamente expresadas. Un cambio de sentido del codón CUG tendría un efecto mucho menor en el metabolismo del hongo de lo que podría preverse si todos los codones se usasen con la misma frecuencia. El cambio de codificación puede haber sucedido por una pérdida gradual de codones CUG en los genes y el tRNA que reconoce el CUG como un codón de Leu, seguida de un suceso de captura; es decir, una mutación en el anticodón de un $tRNA^{Ser}$ que permitiera reconocer el CUG. Alternativamente, puede haber existido una etapa intermedia en la cual CUG fuese reconocida a la vez por Leu y Ser, tal vez con señales contextuales en el mRNA que ayudasen a uno o a otro tRNA a reconocer codones CUG específicos (véase el Recuadro 27-2). El análisis filogenético indica que la reasignación de CUG como codón de Ser ocurrió en los antepasados de Candida hace 150-170 millones de años.

Estas variaciones nos dicen que el código no es tan universal como anteriormente se creía, pero que su flexibilidad está severamente limitada. Las variaciones derivan, obviamente, del código general y no se ha encontrado ningún ejemplo de código completamente diferente. El alcance limitado de las variantes del código refuerza el principio de que todas las formas de vida en este planeta han evolucionado sobre la base de un único (ligeramente flexible) código genético.

TABLA 27-3 Degeneración del código genético

Aminoácido	Número de codones	Aminoácido	Número de codones
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

El balanceo permite que algunos tRNA reconozcan más de un codón

Cuando un aminoácido es especificado por varios codones, la diferencia entre ellos se encuentra, normalmente, en la tercera base (en el extremo 3'). Por ejemplo, la alanina está codificada por los tripletes GCU, GCC, GCA y GCG. Los codones de casi todos los aminoácidos se pueden simbolizar por XY^{A}_{G} o XY^{U}_{C}. Las dos primeras letras de cada codón son los determinantes primarios de la especificidad, hecho que tiene interesantes consecuencias.

Los RNA de transferencia se aparean con los codones del mRNA mediante una secuencia de tres bases del tRNA denominada **anticodón**. La primera base del codón del mRNA (leído en dirección 5'→3') se aparea con la tercera base del anticodón **(Fig. 27-8a)**. Si el anticodón de un tRNA determinado reconociese solamente un codón mediante apareamiento de Watson-Crick en las tres posiciones, las células tendrían un tRNA diferente para cada codón de un aminoácido. Sin embargo, no es así, porque los anticodones de algunos tRNA contienen el nucleótido inosinato (designado por I), que contiene la base poco frecuente hipoxantina (véase la Fig. 8-5b). El inosinato puede formar puentes de hidrógeno con tres nucleótidos diferentes (U, C y A; Fig. 27-8b), si bien estos apareamientos son mucho más débiles que los puentes de hidrógeno de los pares de bases de Watson-Crick (G≡C y A=U). En las levaduras, un $tRNA^{Arg}$ tiene el anticodón (5')ICG, que reconoce tres codones diferentes de la arginina, (5')CGA, (5')CGU y (5')CGC. Las dos primeras bases son idénticas (CG) y forman pares de bases fuertes tipo Watson-Crick con las correspondientes bases del anticodón, pero la tercera base (A, U y C) forma puentes de hidrógeno bastante débiles con el residuo de I en la primera posición del anticodón.

El examen de estos y otros apareamientos codón-anticodón llevaron a Crick a la conclusión de que la tercera base de la mayoría de codones se aparea débilmente con la correspondiente base de los anticodones; en su lenguaje gráfico, la tercera base de tales codones (y la primera base de sus correspondientes anticodones) "se balancean". Crick propuso un conjunto de cuatro relaciones denominadas **hipótesis del balanceo**:

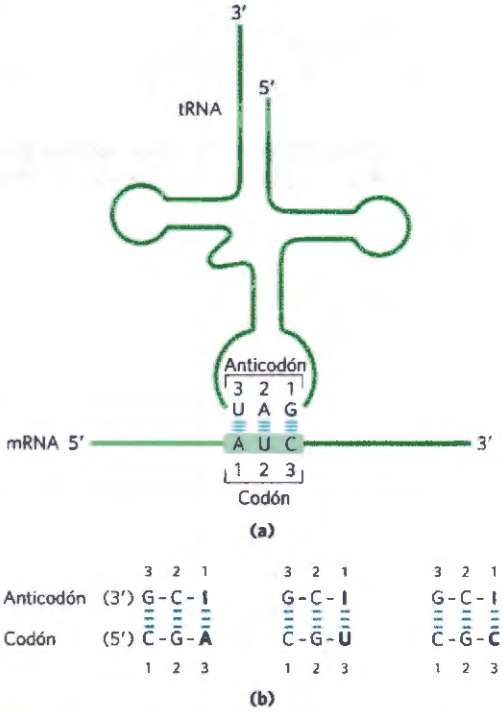


FIGURA 27-8 Relación de apareamiento del codón y el anticodón. (a) El alineamiento de los dos RNA es antiparalelo. El tRNA se representa en la configuración tradicional en hoja de trébol. **(b)** Tres relaciones de apareamiento diferentes del codón son posibles cuando el anticodón del tRNA contiene inosinato.

COPY-STATION

1. Las primeras dos bases de un codón del mRNA siempre forman pares de bases fuertes del tipo Watson-Crick con las bases correspondientes del anticodón del tRNA, y son responsables de la mayor parte de la especificidad del código.
2. La primera base del anticodón (leído en la dirección 5'→3' y apareado con la tercera base del codón) determina el número de codones reconocidos por el tRNA. Cuando la primera base del anticodón es C o A, el apareamiento es específico y sólo un codón es reconocido por el tRNA. Cuando la primera base es U o G, la unión es menos específica y pueden leerse dos codones. Cuando la inosina (I) es el primer nucleótido (de balanceo) del anticodón, pueden reconocerse tres codones diferentes (el máximo para cualquier tRNA). Estas relaciones están resumidas en la Tabla 27-4.
3. Cuando un aminoácido es especificado por varios codones diferentes, los codones que difieren en cualquiera de las dos primeras bases requieren tRNA diferentes.
4. Para traducir los 61 codones se requiere un mínimo de 32 tRNA (31 para codificar los aminoácidos y 1 para el inicio).

La base con balanceo (tercera base) del codón contribuye a la especificidad, pero dado que se aparea débilmente con la base correspondiente del anticodón, permite la rápida disociación del tRNA de su codón durante la síntesis proteica. Si las tres bases de los codones del mRNA formasen apareamientos de Watson-Crick fuertes con las tres bases del anticodón, los

TABLA 27-4 Determinación del número de codones que puede reconocer un tRNA por la base de balanceo del anticodón

1. Un codón reconocido		
Anticodón	(3') X–Y– **C** (5')	(3') X–Y– **A** (5')
Codón	(5') X'–Y'–**G** (3')	(5') X'–Y'–**U** (3')
2. Dos codones reconocidos:		
Anticodón	(3') X–Y– **U** (5')	(3') X–Y– **G** (5')
Codón	(5') X'–Y'–A/G (3')	(5') X'–Y'–C/U (3')
3. Tres codones reconocidos:		
Anticodón	(3') X– Y– **I** (5')	
Codón	(5') X'–Y'–A/U/C (3')	

Nota: X e Y indican bases complementarias capaces de apareamiento de bases fuerte del tipo Watson-Crick con X' e Y', respectivamente. Las bases en las posiciones de balanceo, en la posición 3' de los codones y la posición 5' de los anticodones, están sombreadas en blanco.

COPY-STATION

tRNA se disociarían demasiado lentamente, con lo que la velocidad de síntesis de proteínas se vería severamente limitada. Las interacciones codón-anticodón equilibran los requerimientos de precisión y velocidad.

El código genético es resistente a las mutaciones

El código genético juega un interesante papel en la salvaguarda de la integridad del genoma de todos los seres vivientes. La evolución no produjo un código cuya asignación de codones fuese al azar. Al contrario, el código es sumamente resistente frente a los efectos deletéreos de las mutaciones más comunes, las **mutaciones sin sentido**, en las que una única base es sustituida por otra. En la tercera posición de balanceo del codón, la sustitución de una única base produce un cambio en el aminoácido codificado solamente un 25 % de las veces. La mayoría de estos cambios son, pues, **mutaciones silenciosas**, en las que el nucleótido es diferente pero el aminoácido codificado sigue siendo el mismo.

Debido al tipo de lesiones espontáneas del DNA que afectan al genoma (véase el Capítulo 8), la mutación sin sentido más frecuente es la **mutación de transición**, en la que una purina es sustituida por una purina o una pirimidina por una pirimidina (por ejemplo, el cambio de G≡C por A = T). Las tres posiciones de los codones han evolucionado de manera que ofrecen cierta resistencia a las mutaciones de transición. Una mutación en la primera posición del codón a menudo resulta en un cambio del aminoácido codificado, pero el cambio es a menudo por un aminoácido con propiedades químicas similares. Esto se da especialmente con los aminoácidos hidrofóbicos que dominan la primera columna del código mostrado en la Figura 27-7. Consideremos el codón GUU de la Val. El cambio a AUU sustituiría la Ileu por Val . El cambio a CUU sustituiría la Val por Leu. Los cambios resultantes en la estructura y/o función de la proteína codificada por este gen deberían ser pequeños (aunque no siempre).

Simulaciones informáticas han mostrado que los códigos genéticos diseñados al azar son casi siempre menos resistentes a las mutaciones que el código existente. Los resultados indican que el código fue considerablemente perfeccionado antes de la aparición de LUCA, la célula ancestral.

El código genético explica cómo se almacena en los ácidos nucleicos la información sobre la secuencia proteica y proporciona algunas pistas sobre cómo se traduce esta información en forma de proteína.

El desplazamiento del marco de traducción y la edición de RNA afectan la lectura del código

Una vez establecida el marco de lectura durante la síntesis proteica, los codones se traducen sin solapamiento ni puntuación hasta que el complejo ribosómico topa con un codón de terminación. Las otras dos posibles pautas de lectura normalmente no contienen información genética útil, pero unos pocos genes están estructurados de tal forma que los ribosomas llegados a un cierto punto de la traducción de sus mRNA cambian de marco de lectura. Este mecanismo puede permitir tanto la síntesis de dos o más proteínas distintas, pero relacionadas, a partir de un único transcrito como la regulación de la síntesis de una proteína.

Uno de los ejemplos mejor documentados de **desplazamiento del marco de traducción** tiene lugar durante la traducción del mRNA de los genes solapados *gag* y *pol* del virus del sarcoma de Rous (véase la Fig. 26-34). El marco de lectura de *pol* está desplazado un par de bases hacia la izquierda (pauta de lectura -1) en relación con el marco de lectura de *gag* **(Fig. 27-9)**.

El producto del gen *pol* (la transcriptasa inversa) se traduce como una poliproteína de mayor tamaño a partir del mismo mRNA de la proteína *gag* (véase la Fig. 26-33). La poliproteína, o proteína *gag-pol* es cortada para obtener la transcriptasa inversa madura. La pro-

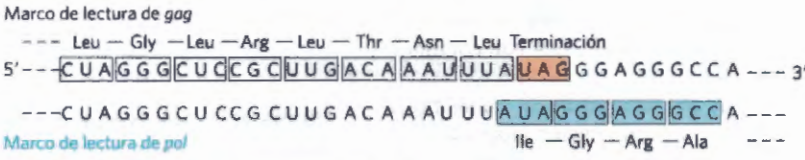


FIGURA 27-9 Desplazamiento del marco de traducción en un transcrito retrovírico. Se muestra la región *gag-pol* de solapamiento del RNA del virus del sarcoma de Rous.

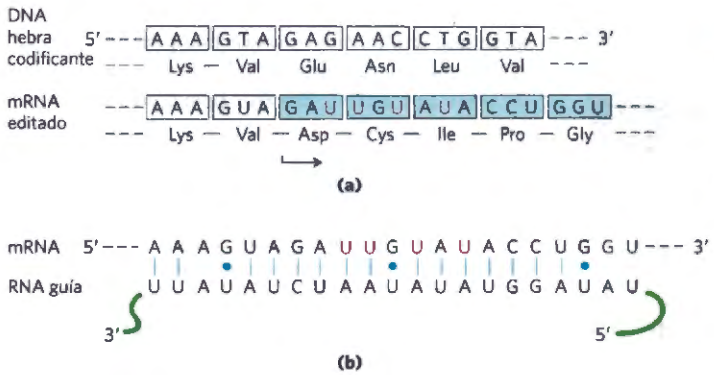


FIGURA 27-10 Edición de RNA en el transcrito del gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa en las mitocondrias de *Trypanosoma brucei*. **(a)** Inserción de cuatro residuos U (rosa) genera un marco de lectura alterado. **(b)** Una clase especial de RNA guía, complementarios del producto editado, actúan de molde para el proceso de edición. Observe la presencia de dos pares de bases G=U, señalados por un punto azul para indicar apareamiento no de Watson-Crick.

ducción de la poliproteína requiere un desplazamiento de la pauta de traducción en la región de solapamiento para permitir que el ribosoma eluda el codón de terminación UAG al final del gen *gag* (de color rosa en la Fig. 27-9).

El desplazamiento del marco de lectura se produce en aproximadamente el 5% de las traducciones de este mRNA, y la poliproteína *gag-pol* (y en último término la transcriptasa inversa) se sintetiza con una frecuencia veinte veces menor que la proteína *gag*, nivel suficiente para la reproducción eficiente del virus. En algunos retrovirus, otro desplazamiento del marco de traducción hace posible la traducción de una proteína incluso más larga, que contiene el producto del gen *env* junto con los productos génicos fusionados *gag* y *pol* (véase la Fig. 26-33). Un mecanismo similar produce las subunidades τ y γ de la DNA polimerasa III de *E. coli* a partir de un único transcrito del gen *dnaX* (véase la Tabla 25-2).

Algunos mRNA son editados antes de la traducción. La **edición de RNA** consiste en la adición, la eliminación o la alteración de nucleótidos en el RNA que afecten el significado del transcrito cuando se traduce. La adición o eliminación de nucleótidos se ha observado principalmente en los RNA derivados de los genomas de mitocondrias y cloroplastos de los eucariotas. Las reacciones requieren una clase especial de moléculas de RNA codificadas en estos mismos orgánulos, con secuencias complementarias de los mRNA editados. Estos RNA guía (gRNA; **Fig. 27-10**) actúan de molde en el proceso de edición.

Los transcritos iniciales de los genes que codifican la subunidad II de la citocromo oxidasa de las mitocondrias de algunos protistas son un ejemplo de edición por inserción. Estos transcritos no se corresponden exactamente con la secuencia del extremo carboxilo-terminal del producto proteico. Un proceso de edición post-transcripcional inserta cuatro residuos U que desplazan el marco de traducción del transcrito. La Figura 27-10 muestra los residuos U añadidos en la pequeña parte del transcrito afectada por la edición. Obsérvese que en el apareamiento de bases entre el transcrito inicial y el RNA guía interviene una serie de pares de bases G=U (puntos azules), que son comunes en las moléculas de RNA.

La edición de RNA por alteración de nucleótidos consiste comúnmente en la desaminación enzimática de residuos adenosina o citidina para formar inosina o uridina, respectivamente **(Fig. 27-11)**, aunque también se han descrito otros cambios de base. La inosina se interpreta como un residuo G en la traducción. Las reacciones de desaminación de la adenosina se llevan a cabo por *a*denosina *d*esaminasas que *a*ctúan sobre el *R*NA **(ADAR)**. Las desaminaciones de la citidina se llevan a cabo por la familia de enzimas del péptido catalítico para la edición de *apo* B (**APOBEC**), entre las que se encuentran las desaminasas inducidas por activación (**AID**). Ambos grupos de enzimas de desaminación poseen un dominio catalítico con zinc coordinado.

La edición de A a I promovida por ADAR es muy común en los transcritos procedentes de genes de primates. La mayor parte de la edición ocurre en elementos Alu, un subgrupo de elementos cortos dispersos (SINE), transposones eucariotas que son particularmente comunes en el genoma humano. El DNA humano contiene más de un millón de elementos Alu (300 bp), que representan cerca del 10% del genoma. Están concentrados cerca de los genes codificantes de proteínas, a menudo en los intrones y en las regiones no traducidas de los extremos 3′ y 5′ de los transcritos. Los mRNA

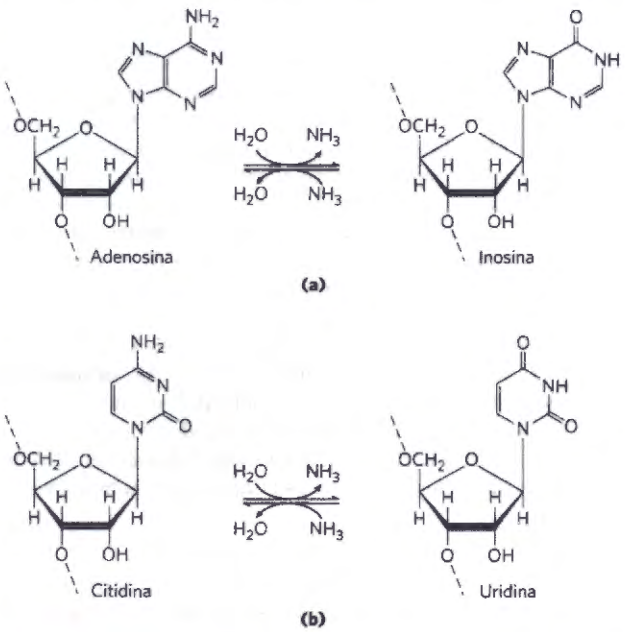


FIGURA 27-11 Reacciones de desaminación en la edición de RNA. **(a)** La conversión de los nucleótidos de adenosina en nucleótidos de inosina está catalizada por enzimas ADAR. **(b)** Las conversiones de citidina a uridina están catalizadas por la familia de enzimas APOBEC.

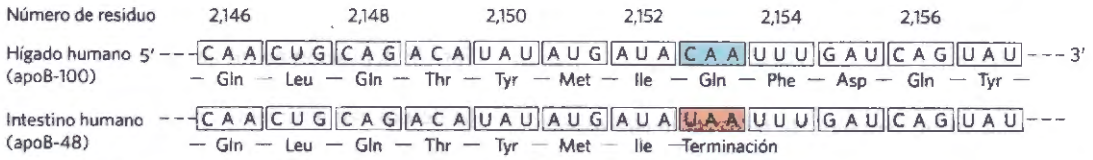


FIGURA 27-12 Edición del transcrito del gen del componente apoB-100 de las LDL. La desaminación, que sólo tiene lugar en el intestino, convierte una citidina específica en una uridina, lo cual cambia un codón de Gln en un codón de terminación, que provoca la síntesis de una proteína truncada.

humanos recién sintetizados (antes de ser procesados) contienen *generalmente* de 10 a 20 elementos Alu. Ciertos microRNAs son también diana de ADAR. Las alteraciones del mRNA generalmente reducen la expresión y/ o función.

Los enzimas ADAR se unen y promueven la edición de A a I sólo en las regiones de doble cadena del RNA. Los abundantes elementos Alu ofrecen muchas oportunidades de apareamiento de bases intramolecular dentro de los transcritos, que suministran las dianas requeridas por las ADAR. La edición también puede afectar a las regiones codificantes de los genes. Se ha relacionado el funcionamiento defectuoso de las ADAR con diversas enfermedades neurológicas, entre las que se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la epilepsia y la depresión profunda.

Los genomas de todos los vertebrados están repletos de SINE, pero en la mayoría de estos organismos se encuentran muchos tipos diferentes de SINE. Los elementos Alu predominan solamente en los primates. El escrutinio detallado de genes y transcritos indica que la edición de A a I es de 30 a 40 veces más frecuente en humanos que en ratones, en gran parte debido a la presencia de muchos elementos Alu. La edición de A a I a gran escala, junto con una mayor frecuencia de corte y empalme alternativo (véase la Fig. 26-19b) son dos características que distinguen el genoma de los primates del de otros mamíferos. No está claro todavía si estas reacciones son accidentales o si jugaron un papel clave en la evolución de los primates y también de los humanos.

Hay seis clases generales de APOBEC citidina deaminasas: APOBEC1-5 y AID. La mayoría de estos enzimas actúan sobre el DNA. Las proteínas AID funcionan en el incremento de la diversidad de los anticuerpos durante la maduración del gen de la inmunoglobulina. (Ver Figs 25-43 y 25-44).

Las proteínas APOBEC tienen un rango de funciones, incluidas la eliminación de retrovirus patogénicos y la expresión genética del retrotransposón, y roles en la inmunidad innata. Las proteínas APOBEC1 y varias APOBEC3 (El genoma humano codifica 7 APOBEC distintas) editan mRNAs. Un ejemplo bien estudiado de edición de RNA por desaminación se da en el gen del componente de apolipoproteína B de la lipoproteína de baja densidad de los vertebrados. Una forma de la apolipoproteína B, apoB-100 (M_r 513.000) se sintetiza en el hígado; una segunda forma, apoB-48 (M_r 250.000) se sintetiza en el intestino. Ambas están codificadas por un mRNA producido a partir del gen de la apoB-100. Una citidina desaminasa APOBEC presente sólo en el intestino se une al mRNA en el codón del residuo aminoácido 2.153 (CAA = Gln) y convierte la C en U, para crear el codón de terminación UAA. La apoB-48 producida en el intestino a partir de este mRNA modificado es simplemente una forma abreviada (correspondiente a la mitad amino-terminal) de apoB-100 **(Fig. 27-12)**. Esta reacción permite la síntesis específica de tejido de dos proteínas diferentes a partir de un solo gen.

Las funciones del APOBEC2, 4 y 5 son poco conocidas. Sin embargo, su capacidad de causar mutaciones genéticas puede hacerlas inseguras para la célula. Uno o más enzimas APOBEC están a menudo sobreexpresados en células tumorales y su capacidad mutagénica puede contribuir en la formación de tumores. Estos también proveen de un mecanismo para introducir mutaciones múltiples en un determinado segmento de un cromosoma, conduciendo a una selectiva y más rápida evolución del DNA de la zona.

RESUMEN 27.1 El Código genético

- La secuencia particular de aminoácidos de una proteína se construye mediante la traducción de la información codificada en el mRNA. Este proceso corre a cargo de los ribosomas.
- Los aminoácidos están especificados por codones del mRNA, consistentes en tripletes de nucleótidos. La traducción requiere moléculas adaptadoras, los tRNA, que reconocen los codones e insertan los aminoácidos en sus posiciones secuenciales apropiadas en el polipéptido.
- Las secuencias de bases de los codones se dedujeron en experimentos que utilizaban mRNA sintéticos de composición y secuencia conocidas.
- El codón AUG señala el inicio de la traducción. Los tripletes UAA, UAG y UGA son señales de terminación.
- El código genético es degenerado: tiene múltiples codones para casi todos los aminoácidos.
- El código genético estándar es universal para todas las especies, con algunos cambios menores en las mitocondrias y en unos pocos organismos unicelulares. Las características de las diferencias refuerzan el concepto de código universal.
- La tercera posición de cada codón es mucho menos específica que la primera y la segunda y se dice que balancea.
- El código genético es resistente a los efectos de las mutaciones sin sentido.
- El desplazamiento del marco de traducción y la edición de RNA afectan la lectura del código genético durante la traducción.
- El RNA editado por ADARs (adenosina deaminasas) y APOBECs (Citidina deaminasas) también alteran la secuencia codificada de varios mRNAs. Varios enzimas APOBEC tienen como objetivo el DNA, siendo su función la de facilitar la diversidad de anticuerpos y la supresión de retrovirus y retrotransposones.

27.2 Síntesis de proteínas

Tal como hemos visto para el DNA y el RNA (Capítulos 25 y 26), la síntesis de biomoléculas poliméricas se puede analizar en términos de fases de inicio, elongación y terminación. Estos procesos fundamentales están flanqueados por dos etapas adicionales: la activación de los precursores con anterioridad a la síntesis y la maduración postsintética del polipéptido completo. La síntesis de proteínas sigue este mismo patrón. La activación de los aminoácidos antes de su incorporación en los polipéptidos y la modificación postraducción del polipéptido una vez completado juegan papeles muy importantes que aseguran la fidelidad de la síntesis y el correcto funcionamiento del producto proteico. El proceso se muestra en la **Figura 27-13**. Los componentes celulares que intervienen en las cinco etapas de la síntesis proteica en *E. coli* y otras bacterias están recogidos en la Tabla 27-5; los requerimientos de las células eucarióticas son muy similares, aunque los componentes pueden ser más numerosos. Un repaso general de las cinco etapas de la síntesis proteica puede ser útil en el análisis posterior.

La biosíntesis de las proteínas tiene lugar en cinco fases

Fase 1: Activación de los aminoácidos La síntesis de un polipéptido de secuencia definida exige el cumplimiento de dos requerimientos químicos fundamentales: (1) El grupo carboxilo de cada aminoácido debe ser activado para facilitar la formación de un enlace peptídico y (2) se ha de establecer un nexo entre cada nuevo aminoácido y la información en el mRNA que lo codifica. Ambos requerimientos están garantizados por la unión del aminoácido a un tRNA en la primera etapa de la síntesis proteica. La unión de cada aminoácido al tRNA que le corresponde es determinante. Esta reacción tiene lugar en el citosol y no en los ribosomas. Cada uno de los 20 aminoácidos se une covalentemente a un tRNA específico, consumiendo energía del ATP y utilizando enzimas activadores dependientes de Mg^{2+}, denominados aminoacil-tRNA sintetasas. Los tRNA unidos a su aminoácido (aminoacilados) se designan como "cargados".

Fase 2: Inicio El mRNA portador del código del polipéptido que se ha de sintetizar se une a la menor de las dos subunidades ribosómicas y al aminoacil-tRNA iniciador. La subunidad ribosómica mayor se une a continuación para formar el complejo de inicio. El aminoacil-tRNA

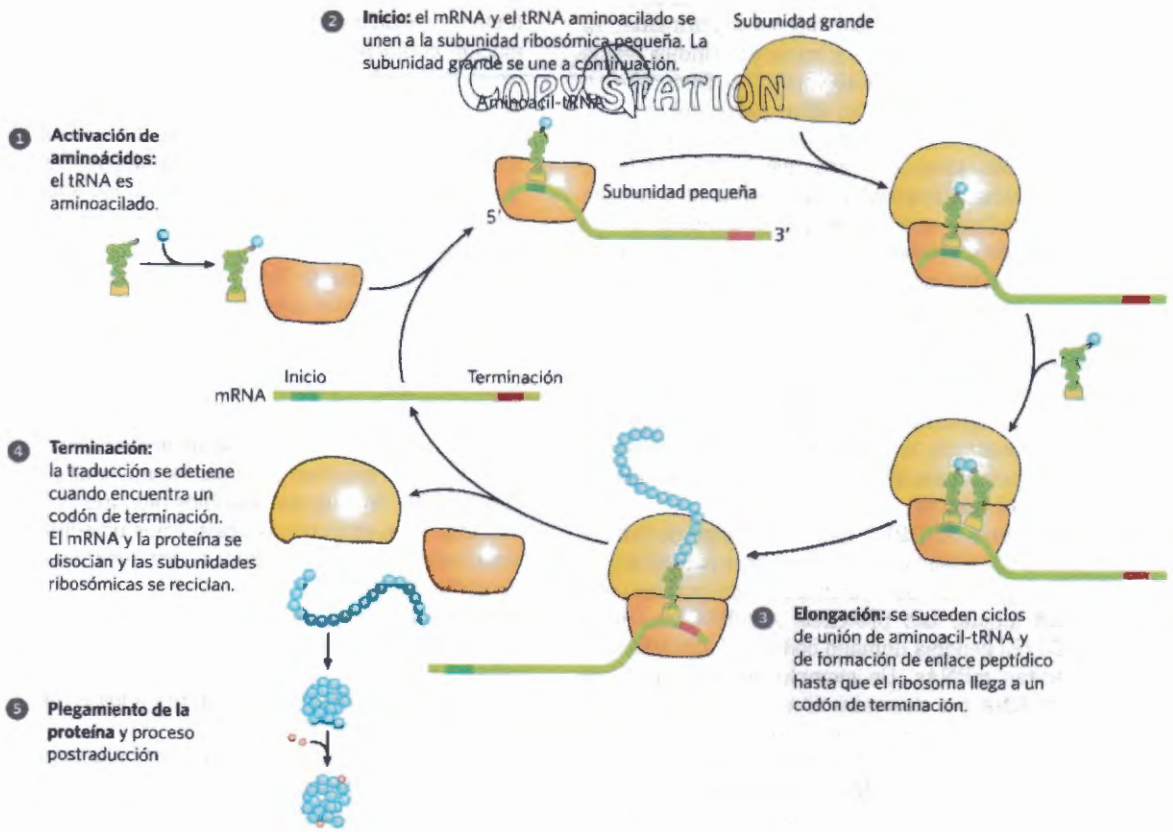


FIGURA 27-13 Visión general de las cinco etapas de la síntesis proteica. 1 Los tRNA son aminoacilados. 2 El inicio de la traducción tiene lugar cuando un mRNA y un tRNA aminoacilado se unen al ribosoma. 3 En la elongación, el ribosoma se mueve a lo largo del mRNA, encajando un tRNA a cada codón y catalizando la formación del enlace peptídico. 4 La traducción termina en un codón de terminación y las subunidades ribosómicas se liberan y reciclan para otra ronda de síntesis proteica. 5 Después de la síntesis la proteína debe plegarse en su conformación activa y se reciclan los componentes del ribosoma. La mayoría de las proteínas son procesadas después de la síntesis. Varios aminoácidos pueden ser eliminados, otros se someten a centenares de modificaciones químicas.

TABLA 27-5 Componentes requeridos en las cinco fases principales de la síntesis de proteínas en *E. coli*

Fase	Componentes esenciales
1. Activación de aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA sintetasas 32 o más tRNA ATP Mg^{2+}
2. Inicio	mRNA *N*-Formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ Codón de inicio en el mRNA (AUG) Subunidad ribosómica 30S Subunidad ribosómica 50S Factores de inicio (IF1,IF2,IF3) GTP Mg^{2+}
3. Elongación	Ribosoma 70S funcional (complejo de inicio) Aminoacil-tRNA especificados por codones Factores de elongación (EF-Tu,EF-Ts,EF-G) GTP Mg^{2+}
4. Terminación y reciclado del ribosoma	Codón de terminación en el mRNA Factores de liberación (RF1, RF2, RF3, RRF) EF-G IF3
5. Plegamiento y modificación postraducción	Chaperonas y enzimas de plegamiento (PPI, PDI); enzimas específicos, cofactores y otros componentes para la eliminación de residuos de inicio y secuencias señal, modificación proteolítica adicional, modificación de residuos terminales, unión de grupos acetilo, fosforilo, metilo, carboxilo, glúcidos o grupos prostéticos

CopyStation

iniciador se aparea con el codón AUG del mRNA, que señala el principio del polipéptido. Este proceso, que requiere GTP, está promovido por proteínas citosólicas específicas denominadas factores de inicio.

Fase 3: Elongación La cadena polipeptídica naciente se alarga mediante la unión covalente de sucesivas unidades de aminoácidos, transportada cada una al ribosoma y posicionada correctamente por su tRNA, que se aparea con su correspondiente codón en el mRNA. La elongación requiere proteínas citosólicas, denominadas factores de elongación. La fijación de los aminoacil-tRNA entrantes y el desplazamiento del ribosoma a lo largo del mRNA están facilitados por la hidrólisis de GTP, a medida que los residuos son añadidos al polipéptido en crecimiento.

Fase 4: Terminación y reciclado del ribosoma La finalización de la cadena polipeptídica está señalada por un codón de terminación del mRNA. A continuación, la cadena polipeptídica se desprende del ribosoma con ayuda de proteínas denominadas factores de liberación, y el ribosoma se recicla para una nueva ronda de síntesis.

Fase 5: Plegamiento y modificación postraducción Para adoptar su forma biológicamente activa, el polipéptido ha de plegarse en su conformación tridimensional adecuada. Antes o después del plegamiento, el nuevo polipéptido puede experimentar modificaciones enzimáticas, entre las que se incluyen la eliminación de uno o más aminoácidos (habitualmente del extremo amino-terminal); la adición de grupos acetilo, fosforilo, metilo, carboxilo u otros grupos a ciertos residuos aminoácidos; el corte proteolítico y/o la unión de oligosacáridos o grupos prostéticos.

Antes de analizar en detalle estas cinco fases, hemos de examinar dos componentes clave de la biosíntesis de proteínas: el ribosoma y los tRNA.

El ribosoma es una compleja máquina supramolecular

Las células de *E. coli* contienen unos 15.000 ribosomas, o más, que representan una cuarta parte del peso seco de la célula. Los ribosomas bacterianos contienen un 65% de rRNA y un 35% de proteína. Tienen un diámetro de unos 18 nm y están compuestos de dos subunidades diferentes con coeficientes de sedimentación de 30S y 50S y un coeficiente de sedimentación combinado de 70S. Ambas subunidades contienen docenas de proteí-



Masayasu Nomura, 1927-2011 [Fuente: Cortesía de Archives, University of Wisconsin-Madison.]

TABLA 27-6 Componentes de RNA y proteínas del ribosoma de *E. coli*

Subunidad	Componentes esenciales	Número total de proteínas	Designación de las proteínas	Número y tipos de rRNA
30S	21	21	S1–S21	1 (16S rRNA)
50S	33	36	L1–L36[a]	2 (5S and 23S rRNAs)

[a]Las denominaciones de proteínas L1 a L36 no corresponden a 36 proteínas diferentes. La proteína originalmente designada como L7 es, de hecho, una forma modificada de L12, y L8 es un complejo de otras tres proteínas. L26 resultó ser la misma proteína que S20 (y no pertenecer a la subunidad 50S). Todo ello da como resultado 33 proteínas diferentes para la subunidad grande. Hay cuatro copias de la proteína L7/L12; las tres copias extra elevan el número total de proteínas a 36.

nas ribosómicas y al menos un rRNA de gran tamaño (Tabla 27-6).

A partir del descubrimiento de Zamecnik de que los ribosomas son los complejos responsables de la síntesis proteica y de la elucidación del código genético, el estudio de los ribosomas experimentó un gran impulso. A finales de la década de 1960, Masayasu Nomura y colaboradores mostraron que ambas subunidades ribosómicas pueden disociarse en sus componentes de RNA y proteína y ser después reconstituidas in vitro. En condiciones experimentales adecuadas, el RNA y la proteína se unen espontáneamente formando subunidades 30S y 50S casi idénticas en estructura y actividad a las subunidades nativas. Este hallazgo fundamental fue determinante durante décadas en la investigación de la estructura y la función de los RNA y las proteínas ribosómicas. Al mismo tiempo, métodos estructurales cada vez más sofisticados fueron revelando más y más detalles de la estructura del ribosoma.

Con el inicio del nuevo milenio se conocieron las primeras estructuras de alta resolución de las subunidades de los ribosomas bacterianos por Venki Ramakrishnam, Thomas Steitz, Ada Yonath, Harry Noller y otros. Estos trabajos fueron la causa de numerosas sorpresas **(Fig. 27-14a)**. En primer lugar, el énfasis tradicional en los componentes proteicos sufrió un desplazamiento. Las subunidades ribosómicas son grandes moléculas de RNA. En la subunidad 50S, los rRNA 5S y 23S forman el núcleo estructural. Las proteínas son elementos secundarios del complejo que decoran la superficie; y lo que es más importante, hasta una distancia de 18 Å del sitio activo para la formación del enlace peptídico no se encuentra proteína. La estructura de alta resolución confirma lo que Harry Noller había predicho mucho antes: el ribosoma es un ribozima. Además de lo que enseñan sobre el mecanismo de la síntesis proteica (tal como se describe más adelante), las estructuras detalladas del ribosoma y de sus subunidades han estimulado una nueva visión sobre la evolución de la vida (Sección 26.3). Los ribosomas de las células eucarióticas también han contribuido a los análisis estructurales (Fig. 27-14b)

El ribosoma bacteriano es complejo, con una masa molecular combinada de ~2,7 millones. Las dos subunidades ribosómicas de forma irregular encajan y forman una hendidura a través de la cual pasa el mRNA a medida que el ribosoma se desplaza durante la traducción. (Fig. 27-14a). Las 57 proteínas de los ribosomas bacterianos son muy diversas en tamaño y forma. Las masas moleculares van de 6.000 a 75.000. La mayoría de proteínas tienen dominios globulares, que se encuentran dispuestos en la superficie del ribosoma. Algunas poseen prolongaciones sinuosas que se introducen en el rRNA del interior del ribosoma estabilizando su estructura. Todavía no se conocen en detalle las funciones de algunas de estas proteínas, aunque es probable que muchas de ellas tengan un papel estructural.

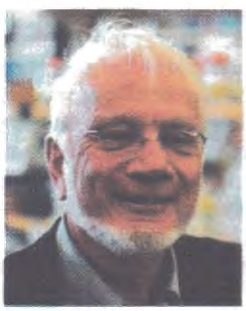
Ya se conocen las secuencias de los rRNA de muchos organismos. Cada uno de los tres rRNA de cadena sencilla de *E. coli* tiene una estructura tridimensional específica con abundante apareamiento de bases intracatenario. Los patrones de plegamiento de los rRNA están muy conservados en todos los organismos, especialmente las regiones que intervienen en funciones clave **(Fig. 27-15)**. La estructura secundaria predicha para los rRNA ha sido en gran parte confirmada por los modelos estructurales de alta resolución, pero no incorpora la extensa red de interacciones terciarias presente en la estructura completa.

Los ribosomas de las células eucarióticas (aparte de los de mitocondrias y cloroplastos) son mayores y más complejos que los ribosomas bacterianos **(Fig. 27-16**; compárese con la Fig. 27-14b). Tienen un diámetro de unos 23 nm y un coeficiente de sedimentación de unos 80S. También tienen dos subunidades cuyo tamaño varía según las especies, pero que por término medio corresponde a 60S y 40S. Los ribosomas eucarióticos contienen en total más de 80 proteínas diferentes. Los ribosomas de mitocondrias y cloroplastos son algo menores y más sencillos que los ribosomas bacterianos. Sin embargo, la estructura y la función de los ribosomas es sorprendentemente similar en todos los organismos y orgánulos.

Tanto en bacterias como en eucariotas, los ribosomas se unen a través de una incorporación jerárquica de r-proteínas a medida que los rRNAs se sintetizan. La



Venkatraman Ramakrishnan [Fuente: © Alastair Grant/AP Photo.]



Thomas A. Steitz [Fuente: © Lucas Jackson/ Reuters/Corbis.]



Ada E. Yonath [Fuente: © Yin Bogu/Xinhua Press/Corbis.]

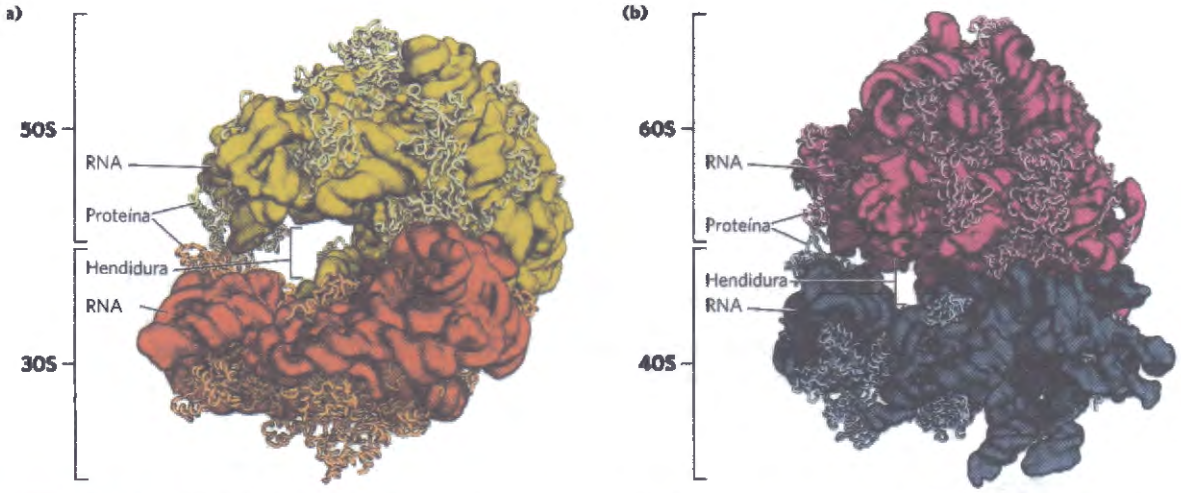


FIGURA 27-14 Estructura de los ribosomas. Nuestra comprensión de la estructura de los ribosomas ha mejorado enormemente gracias a las múltiples imágenes de alta resolución de ribosomas de bacterias y levaduras. **(a)** Ribosoma bacteriano Las subunidades 50S y 30S se unen para formar el ribosoma 70S. La síntesis proteica tiene lugar en una hendidura entre las subunidades. **(b)** El ribosoma de levadura tiene una estructura similar y es algo más complejo [Fuentes: **(a)** procedente de PDB ID 4V4I, A.Korostelev et al. *Cell* 126;1065, 2006 **(b)** procedente de PBD ID 4V7R, A.Ben Shem et al., *Science* 330; 1203, 2010].

mayor parte de la transformación de pre-rRNAs (ver Fig 26-24) ocurre dentro de los grandes complejos ribonucleoproteínicos. La composición de estos cambios complejos cambia a medida que se añaden nuevas r-proteínas, los rRNAs adquieren su forma final, y algunas proteínas necesarias para el procesamiento del rRNA se disocian.

COPY-STATION

Los RNA de transferencia tienen rasgos estructurales característicos

Para entender cómo los tRNA pueden actuar como adaptadores en la traducción del lenguaje de los ácidos nucleicos al de las proteínas, antes hemos de examinar su estructura con más detalle. Los RNA de transferencia

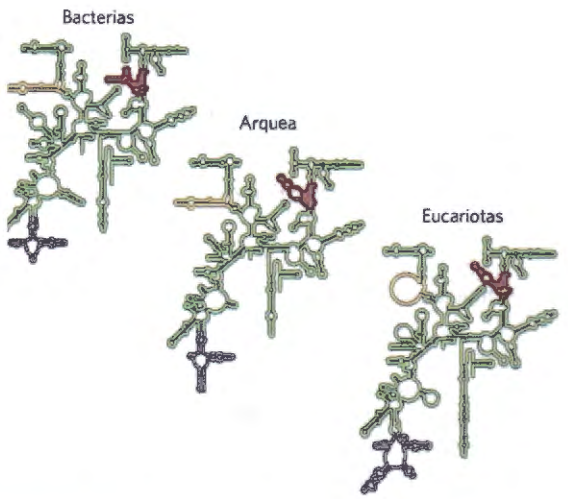


FIGURA 27-15 Conservación de la estructura secundaria de los rRNA de la subunidad pequeña de los tres dominios de la vida. Rojo, amarillo y púrpura indican las estructuras que han divergido en los rRNA de bacterias, arquea y eucariotas. Las estructuras conservadas se muestran en verde. [Fuente: Modificado de www.rna.icmb.utexas.edu]

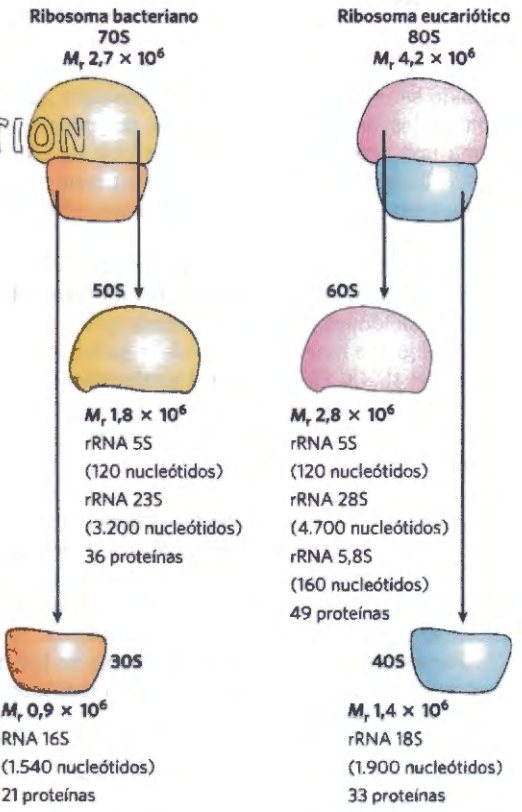


FIGURA 27-16 Resumen de la composición y la masa de los ribosomas en bacterias y eucariotas. Las subunidades ribosómicas se identifican por su valor de S (unidades Svedberg), coeficientes de sedimentación que se refieren a su velocidad de sedimentación en una centrífuga. Los valores de S no son aditivos cuando se combinan las subunidades porque los valores de S son aproximadamente proporcionales a la potencia 2/3 de la masa molecular y también están afectados ligeramente por la forma.

son relativamente pequeños y consisten en una sola hebra de RNA plegada en una estructura tridimensional precisa (véase la Fig. 8-25a). Los tRNA de las bacterias y del citosol de los eucariotas tienen entre 73 y 93 residuos nucleótidos, que corresponden a masas moleculares entre 24.000 y 31.000. Las mitocondrias y los cloroplastos contienen tRNA diferentes, que son algo menores. Las células poseen al menos una clase de tRNA para cada aminoácido; se requieren al menos 32 tRNA para reconocer todos los codones de los aminoácidos (algunos reconocen más de un codón), si bien algunas células utilizan más de 32.

El tRNA de la alanina ($tRNA^{Ala}$) procedente de levadura fue el primer ácido nucleico secuenciado por completo por Robert Holley en 1965. Contiene 76 nucleótidos, 10 de los cuales tienen bases modificadas. La comparación de muchos tRNA de varias especies ha puesto de manifiesto muchos aspectos estructurales comunes **(Fig. 27-17)**. Al menos ocho nucleótidos tienen bases y azúcares modificados, muchos de los cuales son derivados metilados de las bases principales. La mayoría de tRNA tienen un residuo de guanilato (pG) en el extremo 5' y todos tienen la secuencia trinucleotídica CCA(3') en el extremo 3'. Cuando se representan en dos dimensiones, la disposición de los puentes de hidrógeno de todos los tRNA forma una estructura en forma de hoja de trébol con cuatro brazos; los tRNA más largos tienen un quinto brazo, o brazo extra En tres dimensiones, el tRNA tiene forma de L retorcida **(Fig. 27-18)**.



Robert W. Holley, 1922-1993
[Fuente: Bettmann/Corbis.]

Dos de los brazos del tRNA son esenciales para su función de adaptador. El **brazo del aminoácido** lleva un aminoácido específico esterificado por su grupo carboxilo al grupo hidroxilo 2' o 3' del residuo A del extremo 3' del tRNA. El **brazo del anticodón** contiene el anticodón. Los otros brazos principales son el **brazo D**, que contiene el nucleótido infrecuente dihidrouridina, y el **brazo TψC**, que contiene ribotimidina (T), que no se encuentra normalmente en los RNA, y pseudouridina (ψ), que tiene un inusual enlace carbono-carbono entre la base y la ribosa (véase la Fig. 26-22). Los brazos D y TψC tienen una contribución importante en el plegamiento de las moléculas de tRNA, y el brazo TψC interacciona con el rRNA de la subunidad grande.

Habiendo examinado las estructuras de los ribosomas y de los tRNA, consideraremos a continuación las cinco etapas de la síntesis proteica.

Etapa 1: Las aminoacil-tRNA sintetasas unen los aminoácidos correctos a sus tRNA

Durante la primera fase de la síntesis proteica, que tiene lugar en el citosol, las aminoacil-tRNA sintetasas esterifican los 20 diferentes aminoácidos con sus correspondientes tRNA. Cada enzima es específico de un aminoácido y de uno o más de sus tRNA correspondientes. La mayor parte de organismos tienen una aminoacil-tRNA sintetasa para cada aminoácido. En el caso de aminoácidos a los que correspondan dos o más tRNA, normalmente el mismo enzima los aminoacila a todos.

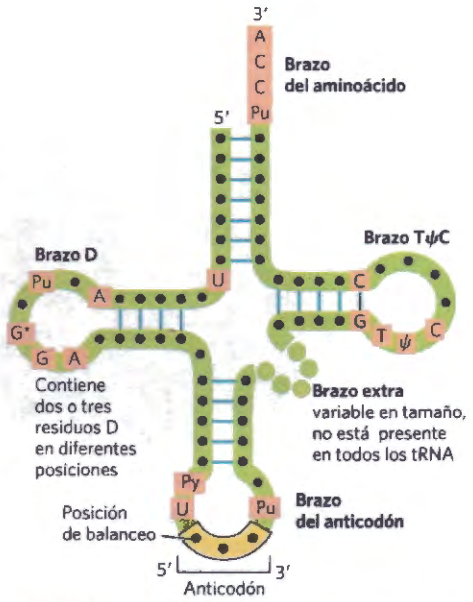


FIGURA 27-17 Estructura secundaria general en hoja de trébol de los tRNA. Los puntos grandes de la cadena fosfodiéster representan residuos nucleóticos; las líneas azules representan pares de bases. Los residuos característicos y/o invariables comunes a todos los tRNA están coloreados en rosa. La longitud de los RNA de transferencia varía entre 73 y 93 nucleótidos. Aparecen nucleótidos adicionales en el brazo extra o en el brazo D. En el extremo del brazo del anticodón se encuentra el bucle del anticodón, que contiene siempre siete nucleótidos no apareados. El brazo D contiene dos o tres residuos D (5,6-dihidrouridina), según el tRNA. En algunos tRNA el brazo D sólo tiene tres pares de bases unidos por puentes de hidrógeno. Los símbolos son: Pu, nucleótido purínico; Py, nucleótido pirimidínico; ψ, pseudouridilato; G*, guanilato o 2'-*O*-metilguanilato.

Se han determinado las estructuras de todas las aminoacil-tRNA sintetasas de *E. coli*. Se han dividido en dos clases (Tabla 27-7), basadas en diferencias en las estructuras primaria y terciaria y en los mecanismos de reacción **(Fig. 27-19)**. Las dos clases se encuentran en todos los organismos y no hay pruebas de que las dos clases compartan un antepasado común. Se desconocen las razones biológicas, químicas o evolutivas de la existencia de dos clases de enzimas implicadas en procesos esencialmente idénticos.

La reacción catalizada por una aminoacil-tRNA sintetasa es

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + PP_i$$

Esta reacción tiene lugar en dos pasos en el sitio activo del enzima. En el paso ❶ (Fig. 27-19), se forma un intermedio ligado al enzima, el aminoacil adenilato (aminoacil-AMP). En el segundo paso, se transfiere el grupo aminoacilo desde el aminoacil-AMP unido al enzima a su correspondiente tRNA específico. El curso de este segundo paso depende de la clase a la que pertenezca el enzima, como muestran las rutas ❷a y ❷b de la Fig. 27-19. El enlace éster resultante entre el ami-

Copy Station

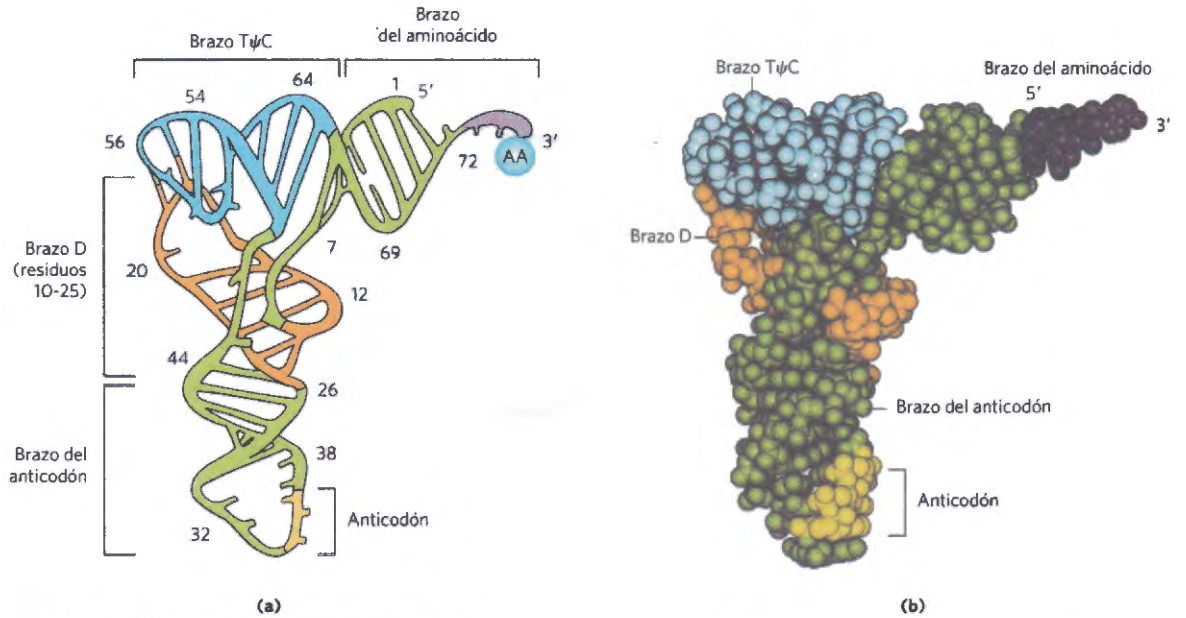


FIGURA 27-18 Estructura tridimensional del $tRNA^{Phe}$ de levadura deducida por análisis de difracción de rayos X. La forma se parece a una L retorcida. **(a)** Esquema con los diferentes brazos identificados en la Fig. 27-17 en diferentes colores. **(b)** Modelo espacial (PDB ID 4TRA) con el mismo código de colores. La secuencia CCA del extremo 3′ (púrpura) es el sitio de unión del aminoácido. [Fuente **(b)** PDB ID 4TRA, E.Westhof et al. , Acta Crystallogr. A44; 112, 1988.]

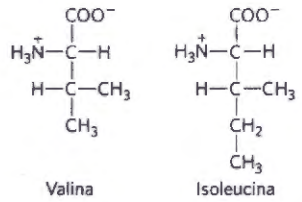
noácido y el tRNA **(Fig. 27-20)** tiene una energía libre estándar de hidrólisis muy negativa ($\Delta G'^{\circ}$ = -29 kJ/mol). El pirofosfato formado en la reacción de activación se hidroliza a fosfato por la pirofosfato inorgánico hidrolasa. Se consumen, por tanto, *dos* enlaces fosfato de alta energía por cada molécula de aminoácido activada, de modo que la reacción global es prácticamente irreversible:

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + 2P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} \approx -29 \text{ kJ/mol}$$

Corrección de pruebas por las aminoacil-tRNA sintetasas

La aminoacilación del tRNA consigue dos objetivos: (1) la activación de un aminoácido para formar un enlace peptídico y (2) asegura la colocación apropiada del aminoácido en una cadena polipeptídica en crecimiento. La identidad del aminoácido unido al tRNA no se comprueba en el ribosoma, por lo que la unión del aminoácido correcto a cada tRNA es esencial para la fidelidad de la síntesis proteica.

Como se recordará del Capítulo 6, la especificidad enzimática está limitada por la energía de unión que puede obtenerse de las interacciones enzima-sustrato. La discriminación entre dos aminoácidos sustrato similares se ha estudiado detalladamente en el caso de la Ile-tRNA sintetasa, que distingue entre la valina y la isoleucina, que difieren solamente en un grupo metileno ($-CH_2-$):



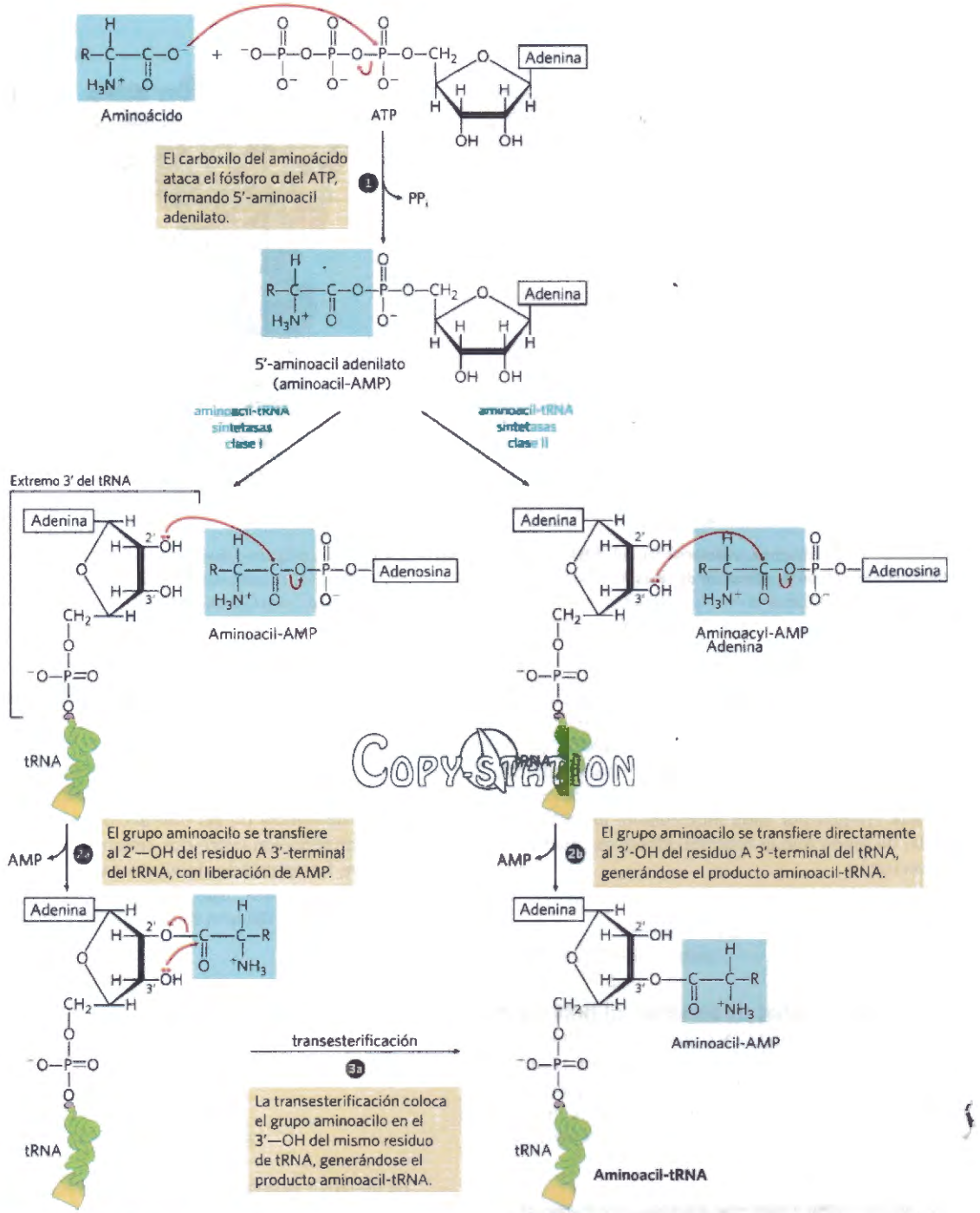
La Ile-tRNA sintetasa favorece la activación de la isoleucina (para formar Ile-AMP) sobre la valina en un factor de 200, como es de esperar de la contribución de un grupo metileno a la unión del sustrato. No obstante, la valina se incorpora a las proteínas en posiciones normalmente ocupadas por la isoleucina con una frecuencia de sólo 1 en 3000. ¿Cómo se obtiene esta mejora de más de diez veces en la precisión? La Ile-tRNA sintetasa, como otras aminoacil-tRNA sintetasas, tiene una función de corrección de pruebas.

Recuerde un principio general de la corrección de pruebas por las DNA polimerasas (véase la Fig. 25-7): si las interacciones de unión disponibles no proporcionan una discriminación suficiente entre dos sustratos, la necesaria especificidad puede conseguirse por la unión específica del sustrato en *dos pasos sucesivos*. El efec-

TABLA 27-7 Dos clases de aminoacil-tRNA sintetasas

Clase I		Clase II	
Arg	Leu	Ala	Lys
Cys	Met	Asn	Phe
Gln	Trp	Asp	Pro
Glu	Tyr	Gly	Ser
Ile	Val	His	Thr

Nota: Aquí, Arg representa arginil-tRNA sintetasa, y así sucesivamente. La clasificación es válida para todos los organismos en los que se han analizado las tRNA sintetasas y se basa en diferencias estructurales de las proteínas y en la distinción mecanística esbozada en la Figura 27-19.



COPY-STATION

FIGURA MECANISMO 27-19 Aminoacilación del tRNA por las aminoacil-tRNA sintetasas. El paso 1 consiste en la formación de un aminoacil adenilato que permanece unido al sitio activo. En el segundo paso, el grupo aminoacilo se transfiere al tRNA. El mecanismo de este paso es algo diferente para las dos clases de aminoacil-tRNA sintetasas (véase la Tabla 27-7). Para los enzimas de la clase I, 2a el grupo aminoacilo se transfiere inicialmente al grupo 2'-hidroxilo del residuo A 3'-terminal, siendo desplazado a continuación 3b al 3'-hidroxilo por una reacción de transesterificación. Para los enzimas de la clase II, 2b el grupo aminoacilo se transfiere directamente al 3'-hidroxilo del adenilato terminal.

to de forzar al sistema a través de dos "filtros" sucesivos es multiplicativo. En el caso de la Ile-tRNA sintetasa, el primer filtro es la unión inicial del aminoácido y su activación a aminoacil-AMP. El segundo filtro consiste en la unión de los productos aminoacil-AMP *incorrectos* a otro sitio activo del enzima. Los sustratos que se unen a este segundo sitio activo son hidrolizados. El grupo R de la valina es ligeramente menor que el de la isoleucina; el Val-AMP encaja en el sitio hidrolítico (de corrección de pruebas) de la Ile-tRNA sintetasa, pero no así el Ile-AMP. De esta forma, Val-AMP es hidrolizado a valina y AMP en el sitio activo corrector de pruebas y el tRNA

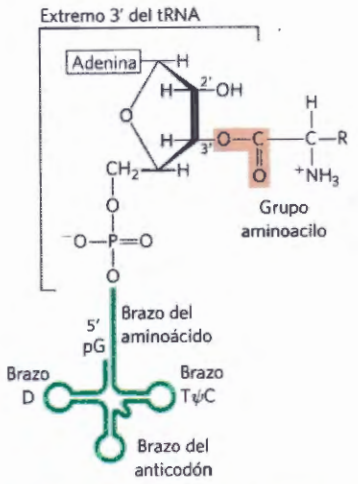


FIGURA 27-20 Estructura general de los aminoacil-tRNA. El grupo aminoacilo está esterificado en la posición 3′ del residuo A terminal. El enlace éster que a la vez activa el aminoácido y lo une al tRNA está coloreado en rosa.

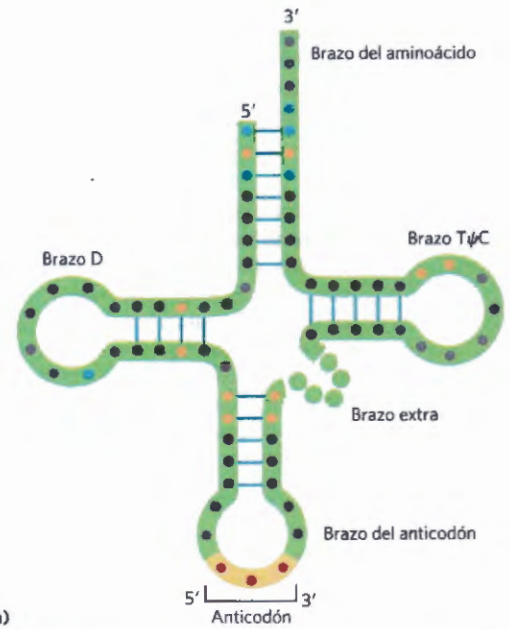
unido a la sintetasa no acaba aminoacilado con el aminoácido incorrecto.

Además de la corrección de pruebas después de la formación del aminoacil-AMP intermediario, la mayoría de aminoacil-tRNA sintetasas también pueden hidrolizar el enlace éster entre los aminoácidos y el tRNA en los aminoacil-tRNA. Esta hidrólisis se acelera mucho en el caso de tRNA cargados incorrectamente, con lo que se consigue un tercer filtro para potenciar la fidelidad del proceso global. Las pocas aminoacil-tRNA sintetasas que activan aminoácidos sin análogos estructurales (Cys-tRNA sintetasa, por ejemplo) muestran poca o ninguna actividad de corrección de pruebas; en estos casos, el sitio activo de aminoacilación puede discriminar suficientemente entre el sustrato correcto y los aminoácidos incorrectos.

La tasa de error media de la síntesis de proteínas (~1 error por 10^4 aminoácidos incorporados) no es tan baja como la de la replicación del DNA. Los errores en una proteína son eliminados cuando la proteína es degradada y, por tanto, no pasan a generaciones sucesivas y tienen menor importancia biológica. El grado de fidelidad de la síntesis proteica es suficiente para asegurar que la mayoría de proteínas no contengan errores y que la gran cantidad de energía necesaria para sintetizar una proteína no sea desaprovechada. Una copia defectuosa de una molécula proteica carece de importancia en presencia de muchas copias correctas de la misma proteína.

Interacción entre una aminoacil-tRNA sintetasa y un tRNA: Un "segundo código genético" Una aminoacil-tRNA sintetasa determinada ha de ser específica no sólo de un único aminoácido sino también de ciertos tRNA. La discriminación entre varias docenas de tRNA es tan importante para la fidelidad global de la biosíntesis de proteínas como la distinción entre aminoácidos. La interacción entre las aminoacil-tRNA sintetasas y los tRNA ha sido calificada como "segundo código genético", para poner de manifiesto su papel fundamental en el mantenimiento de la precisión de la síntesis proteica. Las reglas de "codificación" son aparentemente más complejas que las del "primer" código.

La **Figura 27-21** resume lo que sabemos sobre los nucleótidos que intervienen en el reconocimiento por



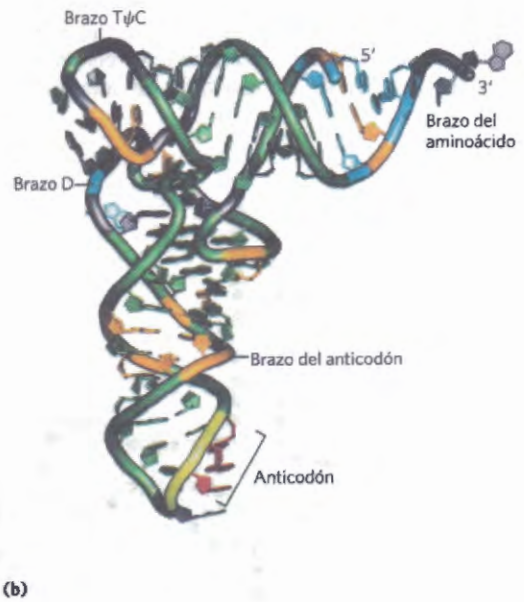


FIGURA 27-21 Posiciones de los tRNA reconocidas por las aminoacil-tRNA sintetasas. (a) Algunas posiciones (puntos púrpura) son idénticas en todos los tRNA, por lo que no pueden utilizarse para discriminar uno de otro. Otras posiciones son sitios de reconocimiento conocidos para una (naranja) o más (azul) aminoacil-tRNA sintetasas. Además de la secuencia, hay otros rasgos estructurales que son importantes para el reconocimiento por algunas sintetasas. **(b)** Los mismos rasgos estructurales se muestran en tres dimensiones, con los residuos en naranja y en azul representando igualmente las posiciones reconocidas por una o más aminoacil-tRNA sintetasas, respectivamente [Fuente: PDB ID 1EHZ; H.Shi and P.B. Moore, *RNA* 6;1091,2000.]

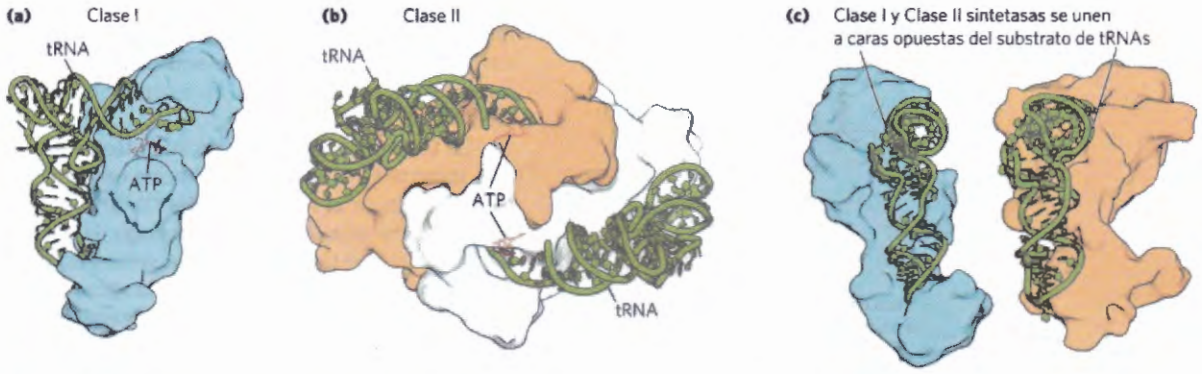


FIGURA 27-22 Aminoacil-tRNA sintetasas. Ambas sintetasas están unidas a los correspondientes tRNA (verde). El ATP unido (rojo) señala el sitio activo cerca del extremo del brazo aminoacilo. **(a)** La Gln-tRNA sintetasa de *E. coli* es una típica sintetasa monomérica del tipo I **(b)** La Asp-tRNA sintetasa de levadura es una típica sintetasa dimérica del tipo II **(c)** Las dos clases de aminoacil tRNA sintetasas reconocen distintas caras de los substratos de tRNA [Fuentes: (a,c (izquierda)) PBD ID 1QRT, J.G. Arnez and T.A. Steitz, *Biochemistry* 35;14,725,1996. (b,c (derecha)) PDB ID 1ASZ, J. Cavalleri et al., *EMBO J.* 13;327, 1994.]

algunas de las aminoacil-tRNA sintetasas. Algunos nucleótidos están conservados en todos los tRNA y, por tanto, no pueden utilizarse para la discriminación. La presencia de cambios de nucleótidos que alteran la especificidad por el sustrato ha permitido identificar las posiciones nucleotídicas que intervienen en la discriminación por las aminoacil-tRNA sintetasas. Estas posiciones parecen estar concentradas en los brazos del aminoácido y del anticodón, incluídos los nucleótidos del propio anticodón, pero también se encuentran en otras partes de la molécula de tRNA. La determinación de las estructuras cristalinas de los complejos de las aminoacil-tRNA sintetasas con tRNA y ATP ha contribuido en gran medida a nuestra comprensión de estas interacciones **(Fig. 27-22)**.

En el reconocimiento de un tRNA por su aminoacil-tRNA sintetasa específica pueden estar implicados diez o más nucleótidos específicos. Sin embargo, en unos pocos casos el mecanismo de reconocimiento es mucho más simple. En una gama de organismos que va de las bacterias al hombre, el determinante primario del reconocimiento del tRNA por la Ala-tRNA sintetasa es un único par de bases G=U en el brazo del aminoácido del $tRNA^{Ala}$ **(Fig. 27-23a)**. Un RNA sintético corto de tan solo 7 pb dispuestas en una sencilla minihélice en horquilla es aminoacilado eficientemente por la Ala-tRNA sintetasa, siempre que el RNA contenga este G=U crítico (Fig. 27-23b). Este sistema relativamente sencillo de la alanina puede ser una reliquia evolutiva de un período en el que los oligonucleótidos de RNA, antepasados del tRNA, eran aminoacilados en un sistema primitivo de síntesis proteica.

La interacción de las aminoacil-tRNA sintetasas con sus correspondientes tRNA es crítica para la lectura correcta del código genético. La expansión del código para incluir un nuevo aminoácido requeriría necesariamente una nueva pareja aminoacil-tRNA sintetasa:tRNA. En la naturaleza se ha observado una expansión limitada del código genético; en el laboratorio se ha conseguido una expansión más amplia (Recuadro 27-2).

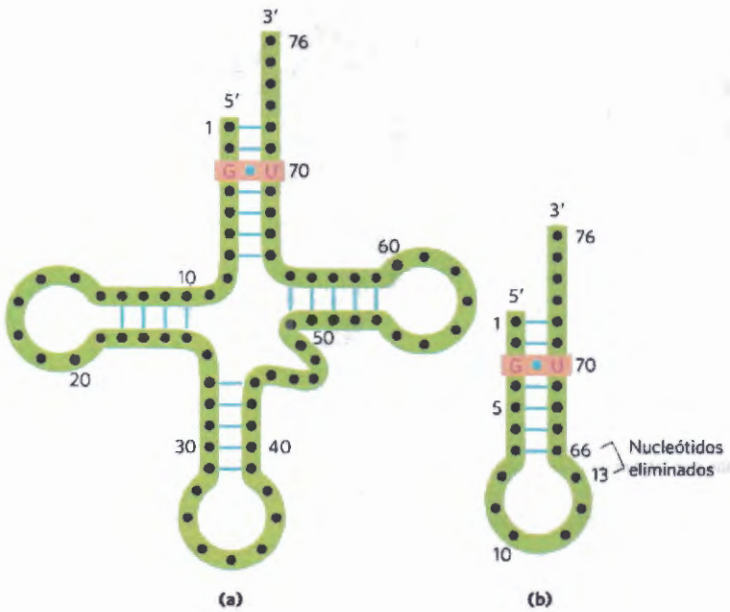


FIGURA 27-23 Elementos estructurales del $tRNA^{Ala}$ requeridos para el reconocimiento por la Ala-tRNA sintetasa. (a) Los elementos estructurales del $tRNA^{Ala}$ reconocidos por la Ala-tRNA sintetasa son muy simples. Un solo par de bases G=U (rosa) es el único elemento necesario para la unión específica y la aminoacilación. **(b)** Una corta minihélice sintética de RNA, que contiene el par de bases crítico G=U, pero que carece de la mayor parte de la estructura restante del tRNA, se aminoacila específicamente con alanina casi tan eficientemente como el $tRNA^{Ala}$ completo.

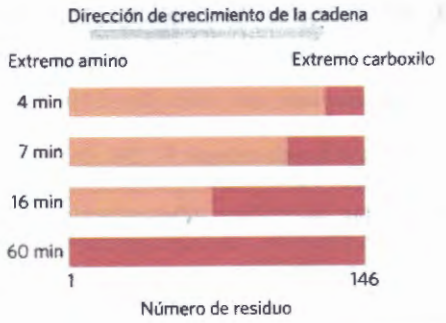


FIGURA 27-24 Demostración de que las cadenas polipeptídicas crecen por adición de nuevos residuos aminoácidos hacia el extremo carboxilo: experimento de Dintzis. Los reticulocitos (eritrocitos inmaduros) sintetizan activamente hemoglobina cuando se incuban con leucina radiactiva (escogida por su abundancia en las cadenas α y β de la globina). Se aislaron cadenas α completas de los reticulocitos a diferentes tiempos y se estudió la distribución de la radiactividad. Las zonas rojo oscuro muestran las zonas de las cadenas completas de α-globina que contienen residuos de Leu radiactivos. A 4 min, sólo estaban marcados unos pocos residuos en el extremo carboxilo de la α-globina, porque las únicas cadenas de globina completas marcadas después de 4 min eran las que casi habían completado su síntesis en el momento de añadir el marcaje. A tiempos de incubación más largos, segmentos cada vez más largos de la cadena polipeptídica contenían residuos marcados, siempre en un bloque en el extremo carboxilo de la cadena. El extremo sin marcar del polipéptido (el extremo amino) se definió de este modo como el extremo de inicio, lo que significa que la cadena polipeptídica crece por adición sucesiva de aminoácidos hacia el extremo carboxilo.

Etapa 2: La síntesis de proteínas empieza con un aminoácido específico

COPY-STATION

La síntesis de proteínas empieza en el extremo amino-terminal y avanza por adición de aminoácidos sucesivos hacia el extremo carboxilo-terminal del polipéptido, tal como estableció Howard Dintzis en 1961 **(Fig. 27-24)**. El codón de inicio AUG especifica, por tanto, un residuo de metionina *amino-terminal*. Aunque sólo existe un codón para la metionina, (5')AUG, todos los organismos contienen dos tRNA para la metionina. Uno de los tRNA se utiliza exclusivamente cuando el (5')AUG es el codón de inicio para la síntesis proteica. El segundo se utiliza para codificar la metionina cuando se encuentra en una posición interna de un polipéptido.

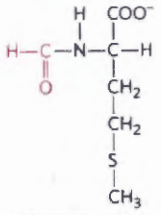
La distinción entre un (5')AUG de inicio y uno interno es sencilla. En las bacterias, los dos tipos diferentes de tRNA específicos para la metionina se designan como $tRNA^{Met}$ y $tRNA^{fMet}$. El residuo aminoácido incorporado de acuerdo con el codón de inicio (5')AUG es *N*-formilmetionina (fMet). Llega al ribosoma como *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ (fMet-$tRNA^{fMet}$), que se forma en dos reacciones sucesivas. En primer lugar, la metionina se une al $tRNA^{fMet}$ por la Met-tRNA sintetasa (que en *E. coli* aminoacila tanto el $tRNA^{fMet}$ como el $tRNA^{Met}$):

$$\text{Metionina} + tRNA^{fMet} + ATP \longrightarrow \text{Met-}tRNA^{fMet} + AMP + PP_i$$

A continuación, una transformilasa transfiere un grupo formilo procedente del N^{10}-formiltetrahidrofolato al grupo amino del residuo Met:

$$N^{10}\text{-Formiltetrahidrofolato} + \text{Met-}tRNA^{fMet} \longrightarrow \text{tetrahidrofolato} + \text{fMet-}tRNA^{fMet}$$

La transformilasa es más selectiva que la Met-tRNA sintetasa; es específica de residuos Met unidos al $tRNA^{fMet}$, posiblemente porque reconoce algún rasgo estructural único de dicho tRNA. En cambio, Met-$tRNA^{Met}$ inserta la metionina en las posiciones interiores de los polipéptidos.



N-Formilmetionina

La adición del grupo *N*-formilo al grupo amino de la metionina por la transformilasa impide que la fMet se incorpore en las posiciones interiores de los polipéptidos y, a la vez, permite que el fMet-$tRNA^{fMet}$ se una a un sitio de inicio específico del ribosoma, que no acepta ni el Met-$tRNA^{Met}$ ni cualquier otro aminoacil-tRNA.

En las células eucarióticas todos los polipéptidos sintetizados por los ribosomas citosólicos empiezan con un residuo Met (en lugar de fMet), pero, de nuevo, la célula utiliza un tRNA iniciador especializado distinto del $tRNA^{Met}$ utilizado en los codones 5'(AUG) de las posiciones interiores del mRNA. Sin embargo, los polipéptidos sintetizados por los ribosomas de las mitocondrias y los cloroplastos empiezan con *N*-formilmetionina. Este hecho apoya fuertemente la idea de que las mitocondrias y los cloroplastos se originaron a partir de antepasados bacterianos, incorporados de manera simbiótica a las células eucarióticas primitivas en una fase temprana de la evolución (véase la Fig. 1-40).

¿Cómo puede un único codón 5'(AUG) distinguir entre la *N*-formilmetionina del principio (o la metionina en el caso de los eucariotas) y los residuos Met interiores? La respuesta se encuentra en los detalles del proceso de inicio.

Las tres etapas del inicio El **inicio** de la síntesis de polipéptidos en las bacterias requiere (1) la subunidad ribosómica 30S, (2) el mRNA que codifica el polipéptido que se ha de sintetizar, (3) el fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador, (4) un conjunto de tres proteínas, denominadas factores de inicio (IF-1, IF-2 e IF-3), (5) GTP, (6) la subunidad ribosómica 50S y (7) Mg^{2+}. La formación del complejo de inicio tiene lugar en tres etapas **(Fig. 27-25)**.

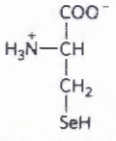
En la etapa ❶, la subunidad ribosómica 30S une los factores de inicio IF-1 e IF-3. IF-3 impide que las subunidades 30S y 50S se unan prematuramente. A continuación, el mRNA se une a la subunidad 30S. El iniciador 5'(AUG) es guiado hasta su posición correcta por la **secuencia de Shine-Dalgarno** (nombrada en referencia a los investigadores australianos John Shine y Lynn Dalgarno, que la identificaron) del mRNA. Esta secuencia consenso es una señal de inicio, de cuatro a nueve residuos purínicos, que se encuentra entre 8 y 13 pb en el lado 5' del codón de inicio **(Fig. 27-26a)**. La secuencia se aparea con una secuencia complementaria rica en

RECUADRO 27-2 Expansión natural y no natural del código genético

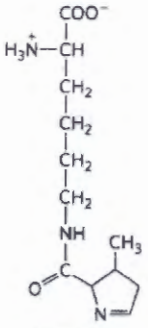
Tal como hemos visto, los 20 aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas ofrecen solamente una funcionalidad limitada. Los seres vivos generalmente superan estas limitaciones mediante el uso de cofactores enzimáticos o modificando determinados aminoácidos una vez han sido incorporados a las proteínas. En principio, la expansión del código genético para introducir nuevos aminoácidos en las proteínas ofrece otra vía para ampliar la funcionalidad, pero es una vía muy difícil de explotar. Tales cambios pueden desembocar fácilmente en la inactivación de millares de proteínas.

La expansión del código genético para incluir un nuevo aminoácido requiere varios cambios celulares. Una nueva aminoacil-tRNA sintetasa debe estar presente, generalmente, junto con su correspondiente tRNA. Ambos componentes deben ser altamente específicos, interaccionando solamente entre sí y con el nuevo aminoácido. El nuevo aminoácido debe encontrarse en concentraciones significativas en la célula, lo que puede implicar la evolución de nuevas rutas metabólicas. Tal como se ha descrito en el Recuadro 27-1, el anticodón del tRNA se aparearía probablemente con un codón que normalmente especificara terminación. Realizar todas estas tareas en una célula viva parece improbable; sin embargo, se ha conseguido, tanto en la naturaleza como en el laboratorio.

Efectivamente, son 22 y no 20 los aminoácidos especificados por el código genético convencional. Los dos aminoácidos extra son la selenocisteina y la pirrolisina, que, aunque se encuentran en unas pocas proteínas, ofrecen una visión de los detalles de la evolución del código.



Selenocisteina



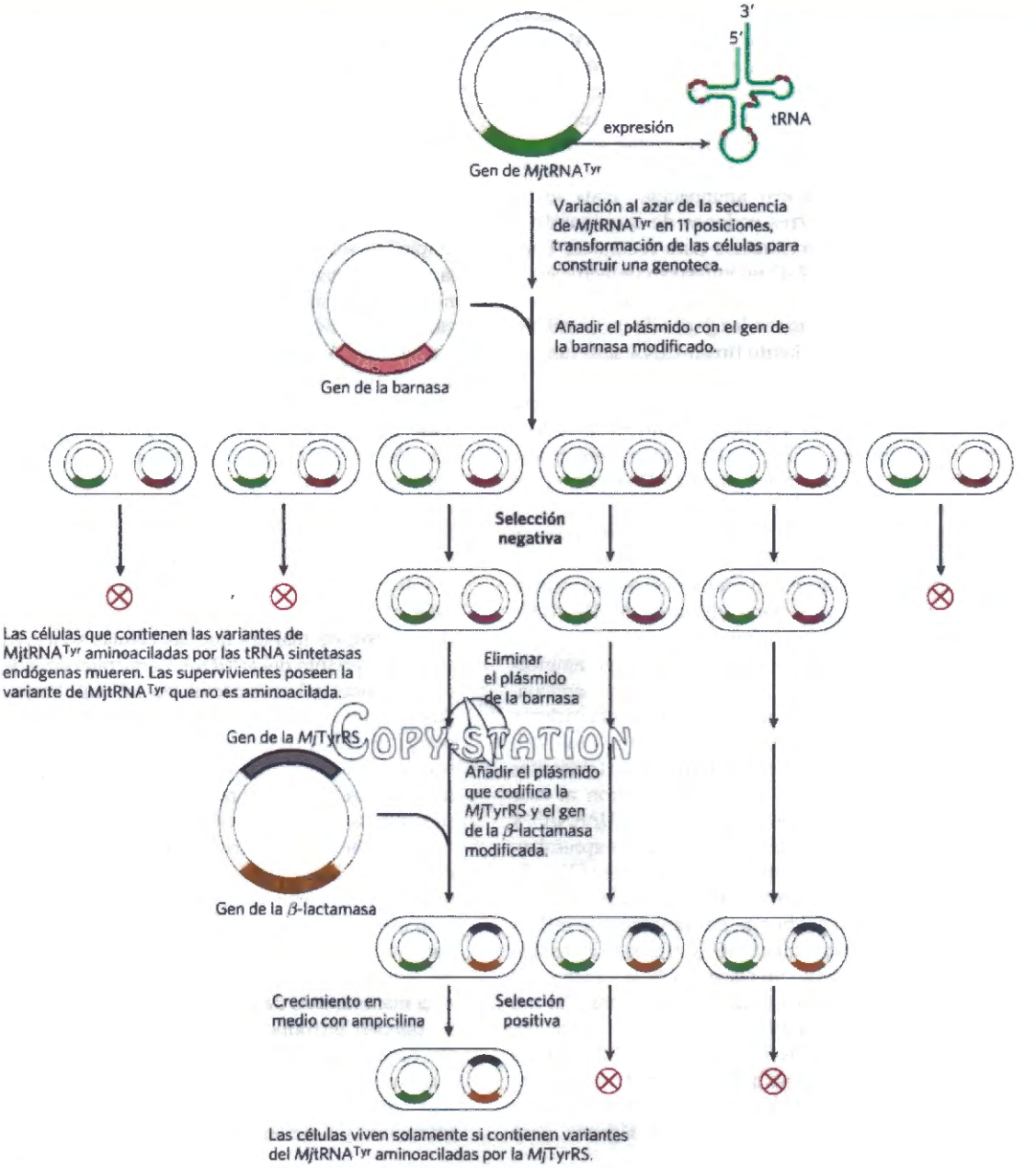
Pirrolisina

Unas pocas proteínas en todas las células (como la formato deshidrogenasa en las bacterias y la glutatión peroxidasa en los mamíferos) requieren selenocisteina para su actividad. En *E. coli*, la selenocisteina se introduce en el enzima formato deshidrogenasa durante la traducción en respuesta a un codón UGA en fase. Un tipo especial de Ser-tRNA, presente a niveles más bajos que otros Ser-tRNA reconoce el UGA y no otros codones. Este tRNA es cargado con serina por la serina aminoacil-tRNA sintetasa normal, y la serina es convertida enzimáticamente en selenocisteína por un enzima independiente antes de su uso en el ribosoma. El tRNA cargado no reconoce cualquier codón UGA; alguna señal contextual del mRNA, todavía por identificar, asegura que este tRNA reconozca sólo los pocos codones UGA, dentro de ciertos genes, que especifican selenocisteína. En efecto, UAG sirve de codón tanto para la terminación como para la selenocisteína (muy raramente). Esta expansión particular del código cuenta con un tRNA específico, como se ha descrito anteriormente, pero carece de la correspondiente aminoacil-tRNA sintetasa. Este proceso es propio de la selenocisteína, pero puede considerarse como un paso intermedio en la evolución de una definición de codones completamente nueva.

La pirrolisina se encuentra en un grupo de arquea anaerobias denominadas metanógenas (véase el Recuadro 22-1). Estos organismos producen metano como un requerimiento de su metabolismo, y el grupo de las Metanosarcináceas pueden usar metilaminas como sustrato de la metanogénesis. La producción de metano a partir de monometilamina requiere el enzima monometilamina metiltransferasa. El gen que codifica este enzima tiene un codón UAG de terminación en el marco de lectura. En 2002 se determinó la estructura de la metiltransferasa y reveló la presencia del nuevo aminoácido pirrolisina en la posición especificada por el codón UAG. Experimentos posteriores demostraron que, al contrario de la selenocisteína, la pirrolisina se unía directamente a un tRNA especializado por la correspondiente pirrolisil-tRNA sintetasa. Estas células producen pirrolisina a través de una ruta metabólica todavía por descubrir. El sistema en su conjunto tiene todas las características de un sistema de asignación de codones, aunque sólo funciona para codones UAG en este gen particular. Como en el caso de la selenocisteína, probablemente haya señales contextuales que dirijan este tRNA hacia el correcto codón UAG.

¿Es posible emular en el laboratorio este logro evolutivo? La modificación de las proteínas con varios grupos funcionales puede suministrar información pertinente sobre la actividad y la estructura de las proteínas. Sin embargo, la modificación de las proteínas es a menudo muy laboriosa. Por ejemplo, añadir un nuevo grupo a una Cys en particular implica bloquear de algún modo las otras Cys que estén presentes en la misma proteína. Alternativamente, podría ser mucho más conveniente adaptar el código genético para que la célula pudiera insertar un aminoácido modificado en un determinado lugar de la proteína. Peter Schultz y colaboradores lo han llevado a cabo.

Copy Station



COPY-STATION

FIGURA 1 Selección de variantes de MjtRNA^{Tyr} que son funcionales solamente con la tirosil tRNA sintetasa MjTyrRS. La secuencia del gen que codifica el MjtRNA^{Tyr}, en un plásmido, se modifica al azar en 11 posiciones que no interaccionan con la MjTyrRS (puntos rojos). Los plásmidos mutados se introducen en células de *E. coli* para crear una genoteca con millones de variantes del MjtRNA^{Tyr}, representadas por las seis células que aquí se muestran. El gen tóxico de la barnasa, modificado para incluir la secuencia TAG, para que su transcrito contenga codones UAG, se suministra en un plásmido aparte, y proporciona la selección negativa. Si este gen se expresa, las células mueren. Sólo puede expresarse si la variante del MjtRNA^{Tyr} expresada en esta célula particular es aminoacilado por aminoacil-tRNA sintetasas endógenas (*E. coli*), que inserten un aminoácido en lugar de detener la traducción. Se modifica también otro gen, que codifica la β-lactamasa, con secuencias TAG que producen codones de terminación UAG. Este gen se suministra en otro plásmido, que también expresa el gen que codifica la MjTyrRS, como un medio de seleccionar positivamente las restantes variantes del MjtRNA^{Tyr}. Las variantes, que son aminoaciladas por la MjTyrRS, permiten la expresión del gen de la β-lactamasa, y hacen posible que las células crezcan en ampicilina. Múltiples rondas de selección positiva y negativa suministran las mejores variantes del MjtRNA^{Tyr}, que son aminoaciladas solamente por la MjTyrRS y usadas eficientemente en la traducción.

Continúa en la página siguiente

RECUADRO 27-2 Expansión natural y no natural del código genético *(continuación)*

Para desarrollar una nueva asignación para un codón, una vez más se necesitan una nueva aminoacil-tRNA sintetasa y un nuevo tRNA afín, ambos adaptados a trabajar solamente con el nuevo aminoácido. Los esfuerzos para crear esta expansión "no natural" del código genético se centraron inicialmente en *E. coli*. El codón UAG fue elegido como el más adecuado para codificar un nuevo aminoácido. UAG es el menos usado de los tres codones de terminación y cepas con tRNA seleccionados para reconocer UAG (véase el Recuadro 27-4) no muestran defectos en el crecimiento. Para crear el nuevo tRNA y la nueva tRNA sintetasa, se tomaron los genes de un tirosil-tRNA y de la correspondiente tirosil-tRNA sintetasa de la arquea *Methanococcus jannaschii* (*Mj*tRNA^{Tyr} y *Mj*TyrRS). La *Mj*TyrRS no se une al lazo del anticodón del *Mj*tRNA^{Tyr}, lo que permite modificar el lazo del anticodón para incluir un CUA (complementario de UAG) sin afectar la interacción. Puesto que los sistemas de las arqueas y las bacterias son ortólogos, los componentes modificados de las arqueas se pudieron transferir a células de *E. coli* sin desorganizar el sistema intrínseco de traducción de las células.

En primer lugar, el gen codificante del *Mj*tRNA^{Tyr} tuvo que modificarse para generar un producto tRNA ideal: que no fuese reconocido por ninguna aminoacil-tRNA sintetasa de *E. coli*, pero que fuese aminoacilado por la *Mj*TyrRS. Se pudo encontrar esta variante a través de una serie de ciclos de selección positiva y negativa diseñados para el escrutinio de las variantes del gen del tRNA (Fig. 1). Se modificaron al azar determinadas regiones de la secuencia del *Mj*tRNA^{Tyr} y se preparó una genoteca de células que expresaban cada una de ellas una versión diferente del tRNA. Se modificó el gen de la barnasa (una ribonucleasa tóxica para *E. coli*) de manera que su transcrito de mRNA presentase varios codones UAG, y el gen se introdujo en las células mediante un plásmido. Si la variante del *Mj*tRNA^{Tyr} expresada en una célula determinada era aminoacilada por una tRNA sintetasa endógena, se expresaría el gen de la barnasa y la célula moriría (selección negativa). Las células supervivientes contendrían variantes de tRNA que no habrían sido aminoaciladas por las tRNA sintetasas endógenas, pero que potencialmente podrían ser aminoaciladas por la *Mj*TyrRS. A continuación, se procedió con un protocolo de selección positiva (Fig. 1), mediante la modificación del gen de la β-lactamasa (que confiere resistencia al antibiótico ampicilina), de manera que su transcrito presentase varios codones UAG. Se introdujo este gen en las células junto con el gen de la *Mj*TyrRS. Las variantes del *Mj*tRNA^{Tyr} que podían ser aminoaciladas por la *Mj*TyrRS permitían el crecimiento en ampicilina sólo si la *Mj*TyrRS también se expresaba en la célula. Varias rondas de este esquema de selección negativa y positiva permitieron identificar una nueva variante del *Mj*tRNA^{Tyr} que no se veía afectada por enzimas endógenos, era aminoacilada por la *Mj*TyrRS y funcionaba correctamente en la traducción.

En segundo lugar, la *Mj*TyrRS tuvo que modificarse para reconocer el nuevo aminoácido. A continuación se mutó el gen codificante de la *Mj*TyrRS para crear una gran genoteca de variantes. Las variantes que aminoacilaban la nueva variante del *Mj*tRNA^{Tyr} con aminoácidos endógenos fueron eliminadas por selección con el gen de ls barnasa. Se llevó a cabo una segunda ronda de selección positiva (similar a la selección con ampicilina descrita anteriormente), de manera que las células sobrevivieran sólo si la variante del *Mj*tRNA^{Tyr} era aminoacilada sólo en presencia del aminoácido no natural. Varias rondas de selección negativa y positiva generaron una pareja de tRNA sintetasa-tRNA afines que reconocía sólo el aminoácido no natural. Estos componentes fueron rebautizados para indicar que en la selección se había usado un aminoácido no natural.

Esta metodología ha permitido construir muchas cepas de *E. coli* capaces de incorporar un aminoácido no natural particular en una proteína en respuesta a un codón UAG. Se ha usado la misma aproximación para expandir artificialmente el código genético de las levaduras e incluso de células de mamífero. De esta manera, más de 30 aminoácidos diferentes (Fig. 2) pueden introducirse eficiente y específicamente en proteínas clonadas. Estos resultados permiten disponer de un conjunto de herramientas flexibles que contribuyen al avance del conocimiento de la estructura y función de las proteínas.

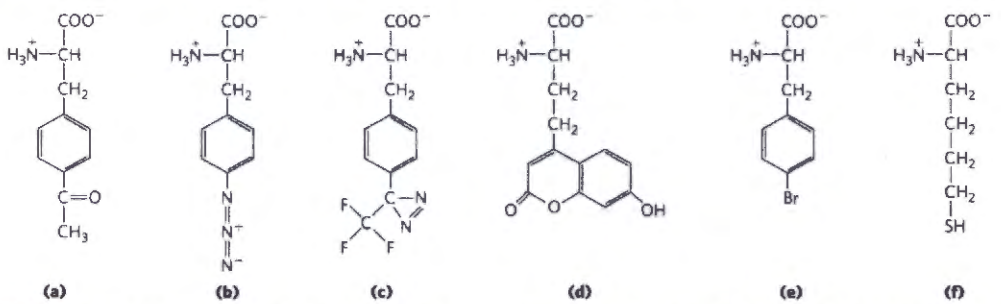


FIGURA 2 Una muestra de aminoácidos no naturales que se han añadido al código genético. Estos aminoácidos no naturales introducen grupos reactivos nuevos, tales como **(a)** una cetona, **(b)** una azida, **(c)** un fotoentrecruzador (un grupo funcional diseñado para formar un enlace covalente con un grupo cercano cuando es activado por la luz), **(d)** un aminoácido muy fluorescente, **(e)** un aminoácido con un átomo pesado (Br) para su uso en cristalografía, y **(f)** un análogo de la cisteína de cadena larga que puede formar puentes disulfuro extendidos.

pirimidinas cerca del extremo 3' del rRNA 16S de la subunidad ribosómica 30S (Fig. 27-26b). Esta interacción mRNA-rRNA sitúa la secuencia de inicio (5')AUG en la posición correcta en la subunidad 30S para el inicio de la traducción. El (5')AUG específico al que debe unirse el fMet-tRNA^{fMet} se distingue de otros codones de metionina por su proximidad a la secuencia Shine-Dalgarno del mRNA.

Los ribosomas bacterianos tienen tres sitios de fijación de tRNA, el **sitio aminoacilo** o **sitio A**, el **sitio peptidilo** o **sitio P** y el **sitio** de **salida** o **sitio E**. Los sitios A y P unen aminoacil-tRNA, mientras que el sitio E une sólo tRNA no cargados que han completado su tarea en el ribosoma. Tanto la subunidad 30S como la 50S contribuyen a las características de los sitios A y P, mientras que el sitio E se encuentra en su mayor parte en la subunidad 50S. El (5')AUG iniciador se sitúa en el sitio P, que es el único sitio al que se puede fijar el fMet-tRNA^{fMet} (Fig. 27-25). El fMet-tRNA^{fMet} es el único aminoacil tRNA que se une primero al sitio P; durante la fase de elongación que viene a continuación, todos los aminoacil tRNA entrantes (incluido el Met-tRNA^{Met}, que se fija a los AUG interiores) se unen primero al sitio A y sólo a continuación se unen a los sitios P y E. El sitio E es el sitio del que se desprenden los tRNA "descargados" durante la elongación. El factor de inicio IF-1 se une al sitio A, impidiendo la unión del tRNA a este sitio durante el inicio.

En el paso ❷ del proceso de inicio (Fig. 27-25), tanto el IF-2 unido a GTP como el fMet-tRNA^{fMet} iniciador se unen al complejo formado por la subunidad ribosómica 30S, el IF-3 y el mRNA. El anticodón de este tRNA se aparea ahora correctamente con el codón de inicio del mRNA.

En el paso ❸, este gran complejo se une a la subunidad ribosómica 50S; al mismo tiempo, el GTP unido al IF-2 se hidroliza a GDP y P_i, que se desprenden del complejo. En este punto, los tres factores de inicio abandonan el ribosoma.

Una vez completadas las etapas mostradas en la Fig. 27-25, se obtiene un ribosoma 70S funcional, denominado **complejo de inicio**, que contiene el mRNA y el fMet-tRNA^{fMet} iniciador. La unión correcta del fMet-tRNA^{fMet} al sitio P del complejo de inicio 70S completo está asegurada por al menos tres puntos de reconocimiento y de unión: la interacción codón-anticodón del AUG iniciador unido al sitio P; la interacción entre la secuencia Shine-Dalgarno del mRNA y el rRNA 16S y las interacciones de unión entre el sitio P del ribosoma y el fMet-tRNA^{fMet}. Llegados a este punto, el complejo de inicio está listo para la elongación.

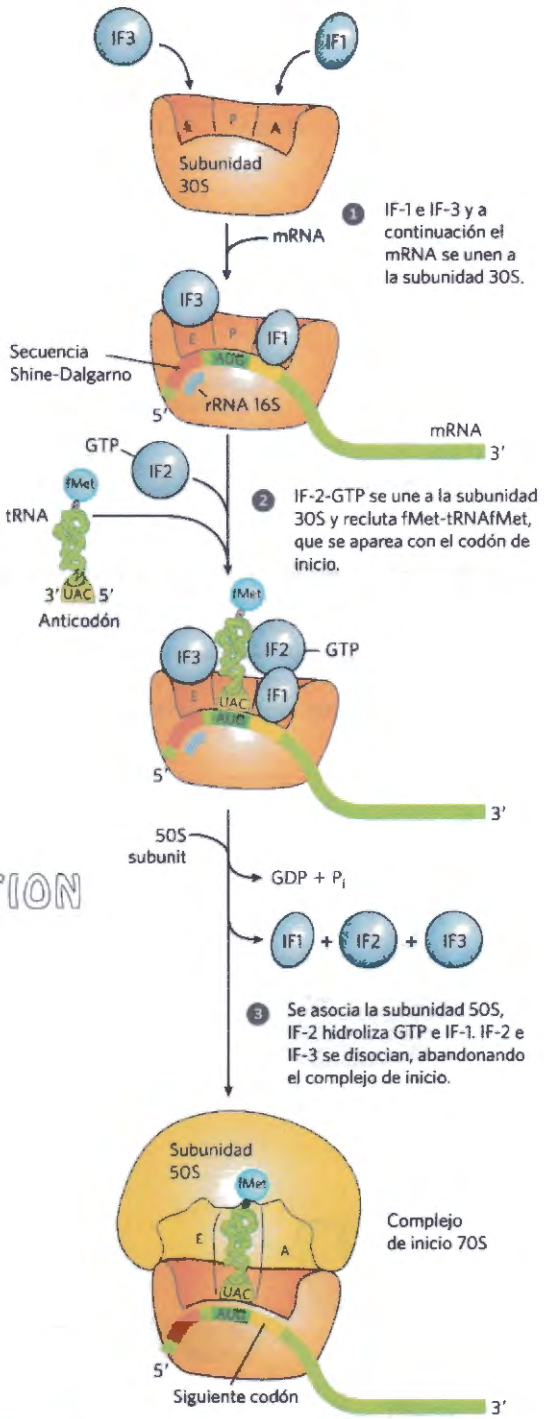


FIGURA 27-25 Formación del complejo de inicio en las bacterias. El complejo se forma en tres pasos (descritos en el texto) a expensas de la hidrólisis de GTP a GDP y P_i. IF-1, IF-2 e IF-3 son factores de inicio. E designa el sitio de salida, P el sitio peptidilo y A el sitio aminoacilo. El anticodón del tRNA está orientado de 3' a 5', de izquierda a derecha, como en la Figura 27-8, pero con orientación opuesta a la de las Figuras 27-21 y 27-23.

El inicio en las células eucarióticas La traducción eucariótica es similar a la traducción bacteriana; la mayor parte de las diferencias significativas se encuentran en el número de componentes y en detalles del mecanismo. El proceso de inicio en los eucariotas se muestra en la **Figura 27-27**. Los mRNA eucarióticos están unidos al ribosoma formando un complejo con un conjunto de proteínas de unión específicas. Las células eucarióticas tienen al menos 12 factores de inicio. Los factores de inicio eIF1A y eIF3, homólogos funcionales de los factores IF-1 e IF-3 bacterianos, se unen a la subunidad 40S en el paso ❶ y bloquean la unión del tRNA al sitio A y la unión prematura de las subunidades menor y mayor, respectivamente. El factor eIF1 se une al sitio E. El tRNA iniciador cargado se une al factor eIF2, al que también se ha unido GTP. En el paso ❷, este complejo ternario se une a la subunidad ribosómica 40S, junto con

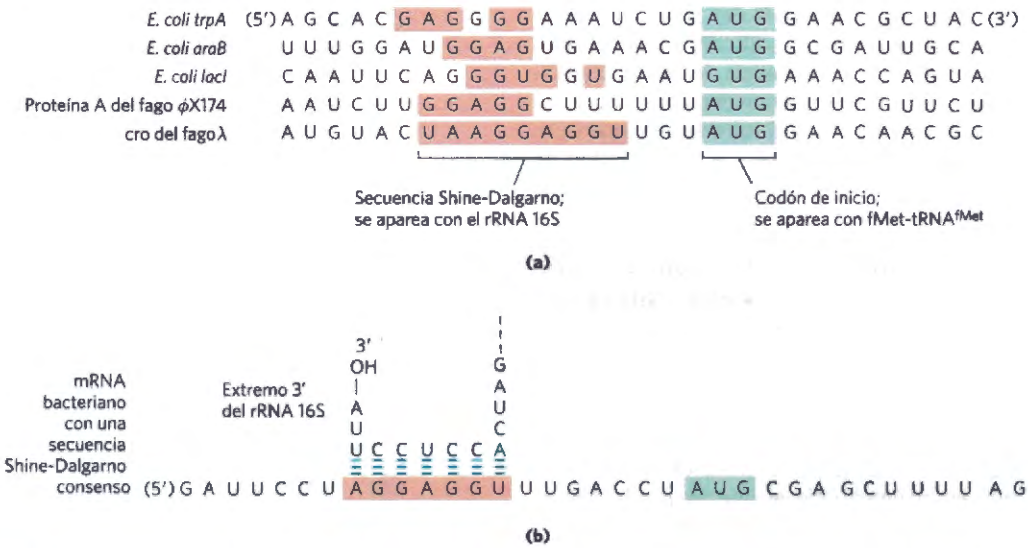


FIGURA 27-26 Secuencias en el RNA mensajero que sirven de señal para el inicio de la síntesis proteica en las bacterias. (a) El alineamiento del AUG de inicio (sombreado en verde) en el lugar correcto de la subunidad ribosómica 30S depende en parte de las secuencias Shine-Dalgarno (en rosa) en el lado 5′. Se muestran porciones de los transcritos de mRNA de cinco genes bacterianos. Obsérvese el caso poco usual de la proteína LacI de *E. coli*, que empieza con un codón GUG (Val) (véase el Recuadro 27-1). En *E. coli*, AUG es el codón de inicio en aproximadamente 91% de los genes, mientras que GUG (7%) y UUG (2%) asumen más raramente esta función **(b)** La secuencia Shine-Dalgarno del mRNA se aparea con una secuencia cerca del extremo 3′ del rRNA 16S.

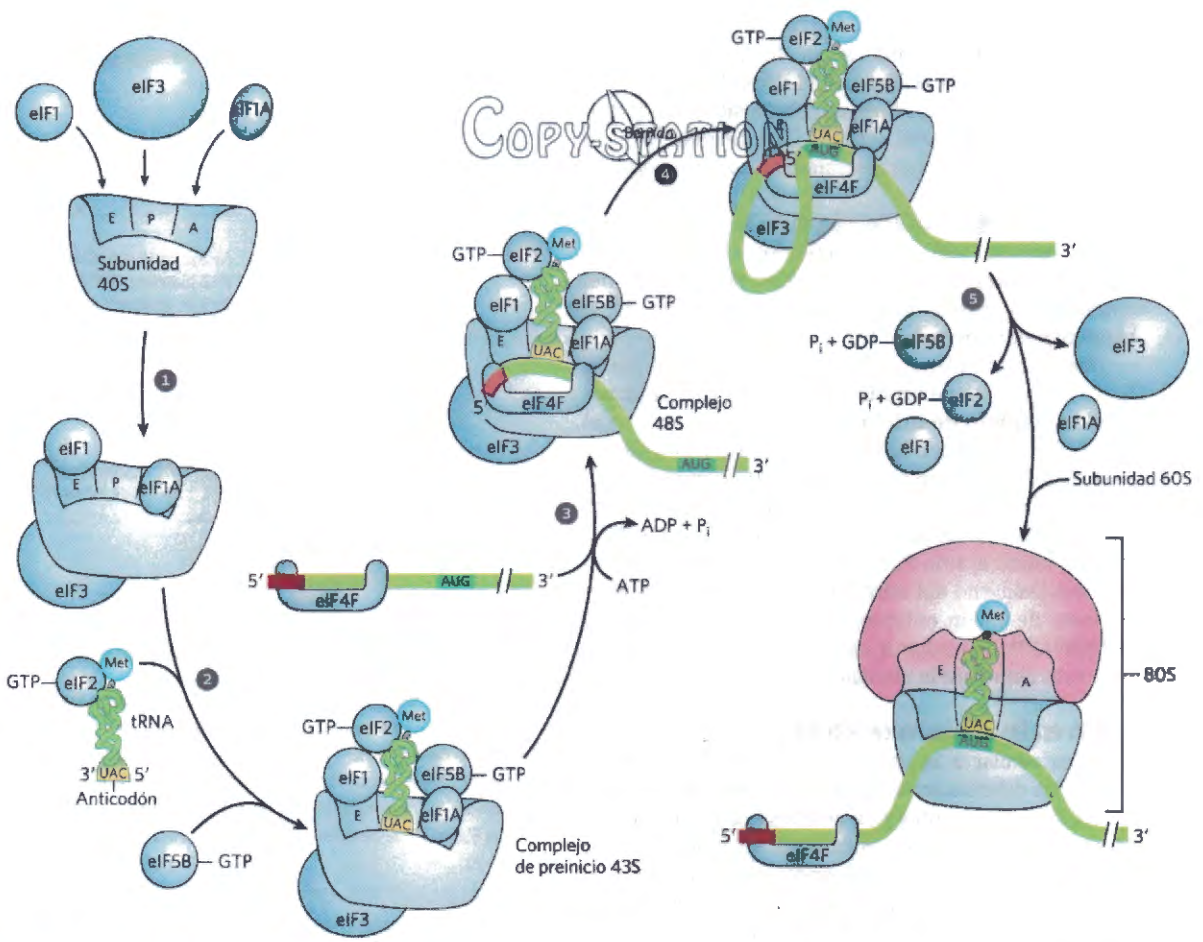


FIGURA 27-27 Inicio de la síntesis proteica en eucariotas. Se muestran los cinco pasos descritos en el texto. Los factores de inicio eucarióticos facilitan la asociación primero del tRNA iniciador cargado para formar un complejo 43S y a continuación el mRNA (con el casquete en 5′ en rojo) para formar el complejo 48S. El complejo final de inicio se forma cuando se une la subunidad 60S, junto con la liberación de la mayoría de los factores de inicio.

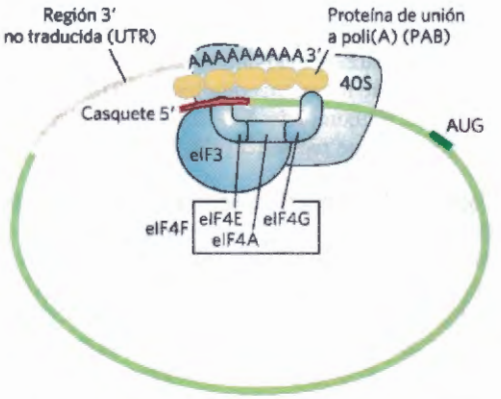


FIGURA 27-28 Circularización del mRNA en el complejo de inicio eucariótico. Los extremos 3' y 5' de los mRNA eucarióticos están unidos por el complejo proteico eIF4F. La subunidad eIF4E se une al casquete 5' y la proteína eIF4G se une a la proteína de unión a poliA (PAPB) en el extremo 3' del mRNA. La proteína eIF4G también interacciona con eIF3, uniendo así el mRNA circularizado a la subunidad 40S del ribosoma.

otras dos proteínas implicadas en pasos posteriores, eIF5 (no mostrada en la Fig. 27-27) y eIF5B. De esta manera se forma el complejo de preinicio 43S. El complejo eIF4F está formado por eIF4E (que se une al casquete 5'), eIF4A (una ATPasa y RNA helicasa) y eIF4G (una proteína de unión). La proteína eIF4G se une a eIF3 y a eIF4E, estableciendo la primera interacción entre el complejo de preinicio 43S y el mRNA. El eIF4G también se une ❸ a la proteína de unión a poliA (PABP) en el extremo 3' del mRNA, circularizándolo **(Fig. 27-28)** y facilitando la regulación traduccional de la expresión génica, tal como se describe en el Capítulo 28.

La adición del mRNA y sus factores asociados crea un complejo 48S. Este complejo recorre el mRNA unido a partir del casquete 5' hasta que encuentra un codón AUG. El proceso de barrido (paso ❹ en la Fig. 27-27) podría estar facilitado por la RNA helicasa de eIF4A y otro factor unido (eIF4B no mostrado en la Fig. 27-27) cuya actividad molecular precisa se desconoce.

Una vez se ha detectado el sitio AUG iniciador, la subunidad ribosómica 60S se asocia al complejo en el paso ❺, proceso acompañado de la liberación de muchos de los factores de inicio. Ello requiere la actividad de eIF5 y eIF5b. La proteína eIF5 promueve la actividad GTPasa de eIF2, generando un complejo eIF2-GDP con afinidad reducida para el tRNA iniciador. La proteína eIF5B es homóloga de la IF-2 bacteriana. Hidroliza el GTP unido y provoca la disociación del eIF2-GDP y otros factores de inicio, justo antes de la unión de la subunidad 60S. De este modo se completa la formación del complejo de inicio.

Las funciones de los diversos factores de inicio bacterianos y eucarióticos están resumidas en la Tabla 27-8. Los mecanismos de acción de estas proteínas constituyen una importante área de investigación.

Etapa 3: Los enlaces peptídicos se forman durante la fase de elongación

La tercera fase de la síntesis de proteínas es la **elongación**. De nuevo, empezamos con las células bacterianas. La elongación requiere (1) el complejo de inicio descrito anteriormente, (2) aminoacil-tRNA, (3) un conjunto de tres proteínas citosólicas solubles denominadas **factores de elongación** (EF-Tu, EF-Ts y EF-G en las bacterias) y (4) GTP. Para añadir cada residuo aminoácido son necesarios tres pasos, que se repiten tantas veces como residuos deban añadirse.

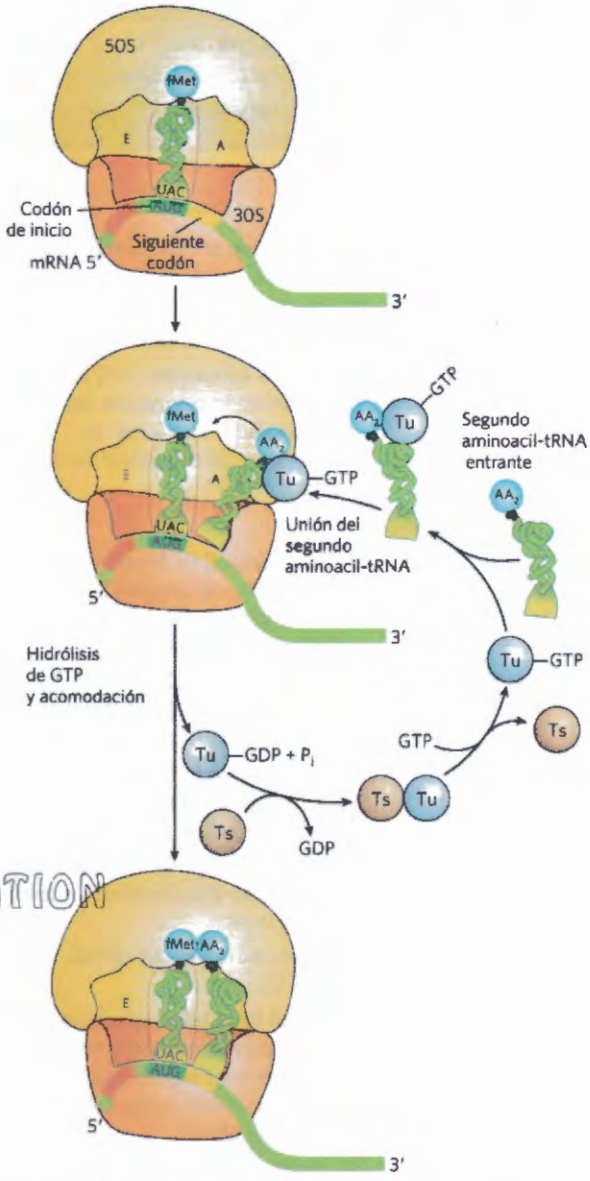


FIGURA 27-29 Primer paso de la elongación en las bacterias: unión del segundo aminoacil-tRNA. El segundo aminoacil-tRNA (AA_2) entra en el sitio A del ribosoma unido a EF-Tu (mostrado como Tu), que también contiene GTP. La unión del segundo aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma va acompañada de la hidrólisis del GTP a GDP y P_i y de la liberación del complejo EF-Tu-GDP del ribosoma. El GDP unido se libera cuando el complejo EF-Tu-GDP se une a EF-Ts; seguidamente se libera el EF-Ts cuando otra molécula de GTP se une a EF-Tu. De esta forma se recicla EF-Tu, que puede repetir el ciclo. La acomodación implica un cambio conformacional en el segundo tRNA que tira del extremo aminoacilo hacia el sitio peptidil transferasa.

Paso 1 de la elongación: Unión de un aminoacil-tRNA entrante En el primer paso del ciclo de elongación **(Fig. 27-29)**, el aminoacil-tRNA entrante adecuado se fija a

TABLA 27-8 Factores proteicos requeridos para el inicio de la traducción en las bacterias y en las células eucarióticas

Factor	Función
Bacterianos	
IF-1	Evita la unión prematura del tRNA al sitio A
IF-2	Facilita la unión de fMet-tRNA^{fMet} a la subunidad ribosómica 30S
IF-3	Se une a la subunidad 30S; impide la asociación prematura de la subunidad 50S; mejora la especificidad del sitio P hacia fMet-tRNA^{fMet}
Eucarióticos	
eIF1	Se une al sitio E de la subunidad 40S; facilita la interacción entre el complejo ternario eIF2-tRNA-GTP y la subunidad 40S
eIF1A	Homólogo del IF-1 bacteriano; impide la unión prematura de los tRNA al sitio A
eIF2	GTPasa; facilita la unión del Met-tRNA^{Met} de inicio a la subunidad ribosómica 40S
eIF2B*, eIF3	Primeros factores que se unen a la subunidad 40S; facilitan los pasos posteriores
eIF4F	Complejo formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G
eIF4A	Actividad RNA helicasa; elimina la estructura secundaria del mRNA para permitir su unión a la subunidad 40S; parte del complejo eIF4F
eIF4B	Se une al mRNA; facilita el barrido del mRNA para localizar el primer AUG
eIF4E	Se une al casquete 5' del mRNA; parte del complejo eIF4F
eIF4G	Se une a eIF4E y a la proteína de unión a poli(A) (PABP); parte del complejo eIF4F
eIF5*	Promueve la disociación de otros factores de inicio de la subunidad 40S como preludio de la asociación de la subunidad 60S para formar el complejo de inicio 80S
eIF5b	GTPasa homóloga de la bacteriana IF-2; promueve la disociación de factores de inicio antes de la formación final del ribosoma

*No mostrado en la Figura 27-27.

un complejo de EF-Tu que contiene GTP. El complejo resultante aminoacil-tRNA-EF-Tu-GTP se une a continuación al sitio A del complejo de inicio 70S. El GTP se hidroliza y se libera un complejo EF-Tu-GDP del ribosoma 70S. El complejo EF-Tu-GTP se regenera en un proceso en que participan EF-Ts y GTP.

Paso 2 de la elongación: Formación del enlace peptídico

Se forma ahora un enlace peptídico entre los dos aminoácidos unidos mediante sus tRNA a los sitios A y P del ribosoma. Ello tiene lugar por transferencia del grupo *N*-formilmetionil iniciador desde su tRNA al grupo amino del segundo aminoácido, que se encuentra ahora en el sitio A **(Fig. 27-30)**. El grupo α-amino del aminoácido en el sitio A actúa de nucleófilo, desplazando el tRNA en el sitio P para formar el enlace peptídico. Esta reacción produce un dipeptidil-tRNA en el sitio A, mientras que el ahora "descargado" (desacilado) tRNA^{fMet} permanece unido al sitio P. A continuación, los tRNA adoptan un modo de unión híbrido, con elementos de cada uno abarcando dos sitios de unión diferentes en el ribosoma, tal como se muestra en la Figura 27-30.

La actividad enzimática que cataliza la formación del enlace peptídico se ha conocido históricamente como **peptidil transferasa** y se suponía que era intrínseca de una o más de las proteínas de la subunidad ribosómica grande. Ahora sabemos que esta reacción está catalizada por el rRNA 23S, función que hay que añadir al repertorio catalítico conocido de los ribozimas. Este descubrimiento tiene interesantes implicaciones para la evolución de la vida (Capítulo 26).

COPY-STATION

Paso 3 de la elongación: Translocación En el último paso del ciclo de elongación, la **translocación**, el ribosoma se desplaza un codón hacia el extremo 3' del mRNA **(Fig. 27-31a)**. Este movimiento desplaza el anticodón del dipeptidil-tRNA, que está unido todavía al segundo codón del mRNA, desde el sitio A al sitio P y desplaza el tRNA desacilado del sitio P al sitio E, de donde el tRNA es liberado al citosol. El tercer codón del mRNA se encuentra ahora en el sitio A y el segundo codón en el sitio P. El movimiento del ribosoma a lo largo del mRNA requiere EF-G (también denominado translocasa) y la energía proporcionada por la hidrólisis de otra molécula de GTP. Un cambio en la conformación tridimensional global del ribosoma hace posible su movimiento a lo largo del mRNA. Puesto que la estructura del EF-G es semejante a la estructura del complejo EF-Tu/tRNA (Fig. 27-31b), el EF-G puede unirse al sitio A y posiblemente desplazar al peptidil-tRNA.

Después de la translocación, el ribosoma, con su dipeptidil-tRNA y mRNA unidos, se encuentra ahora disponible para otro ciclo de elongación y para la unión de un tercer residuo aminoácido. Este proceso tiene lugar de la misma forma que la adición del segundo residuo (tal como se muestra en las Figs 27-29, 27-30 y 27-31). Por cada residuo aminoácido correctamente unido al polipéptido en crecimiento, se hidrolizan dos GTP a GDP y Pi, a medida que el ribosoma se desplaza de codón en codón a lo largo del mRNA hacia el extremo 3'.

El polipéptido permanece unido al tRNA del último aminoácido incorporado. Esta asociación mantiene la conexión funcional entre la información en el mRNA y

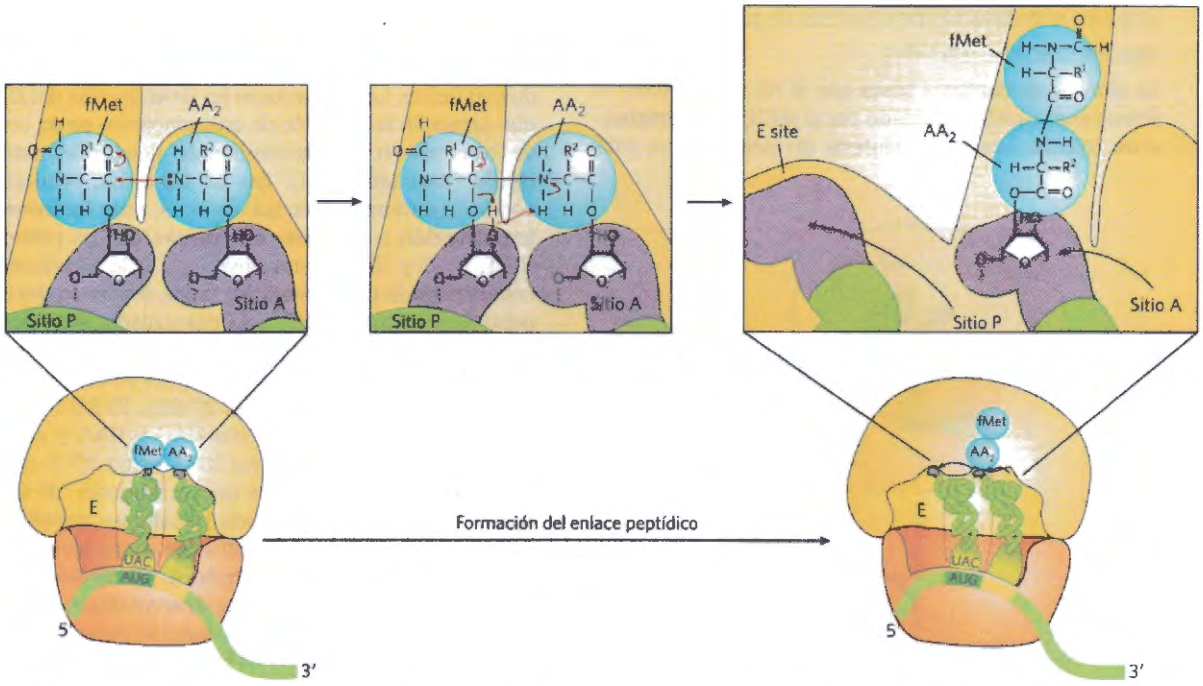


FIGURA 27-30 Segundo paso de la elongación en las bacterias: formación del primer enlace peptídico. La peptidil transferasa que cataliza esta reacción es la ribozima rRNA 23S. El grupo *N*-formilmetionilo se transfiere al grupo amino del segundo aminoacil-tRNA en el sitio A, formando un dipeptidil-tRNA. En este momento, ambos tRNA unidos al ribosoma se desplazan sobre la subunidad 50S para adoptar un estado de unión híbrido. El tRNA no cargado se desplaza de forma que los extremos 3' y 5' se encuentran en el sitio E. Análogamente, los extremos 3' y 5' del peptidil tRNA se desplazan al sitio P. Los anticodones permanecen en los sitios P y A. Observe la participación en esta reacción del grupo 2' hidroxilo de la adenosina 3' terminal como catalizador ácido-base general.

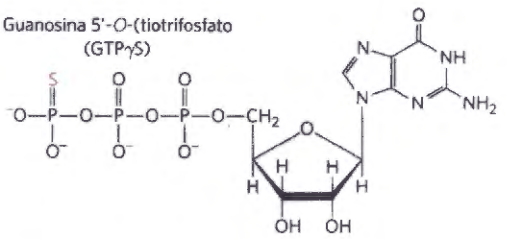
COPY-STATION

su producto polipeptídico. Al mismo tiempo, el enlace éster entre este tRNA y el extremo carboxilo del polipéptido en crecimiento activa el grupo carboxilo-terminal para el ataque nucleofílico por el aminoácido entrante para formar un nuevo enlace peptídico (Fig. 27-30). Aunque se rompe el enlace éster entre el polipéptido y el tRNA durante la formación del enlace peptídico, el vínculo entre el polipéptido y la información del mRNA se mantiene porque cada nuevo aminoácido añadido se encuentra aún unido a su tRNA.

El ciclo de elongación en los eucariotas es muy similar al de las bacterias. Tres factores de elongación eucarióticos (eEF1α, eEF1$\beta\gamma$ y eEF2) tienen funciones análogas a las de los factores de elongación bacterianos (EF-Tu, EF-Ts y EF-G, respectivamente). Cuando una nueva aminoacil-tRNA se une al sitio A, una interacción alostérica conduce a la eyección del tRNA sin carga desde el sitio E.

La corrección de pruebas en el ribosoma La actividad GTPasa del EF-Tu durante el primer paso de la elongación en las células bacterianas (Fig. 27-29) contribuye de forma sustancial a la velocidad y fidelidad del proceso biosintético en su conjunto. Tanto el complejo EF-Tu-GTP como el complejo EF-Tu-GDP tienen un tiempo de vida de unos pocos milisegundos antes de disociarse. Estos dos intervalos proporcionan una oportunidad para verificar las interacciones codón-anticodón. Los aminoacil-tRNA incorrectos normalmente se disocian del sitio A durante uno de estos períodos. Si en lugar de GTP se usa el análogo 5'-*O*-(3-tiotrifosfato) (GTPγS), la hidrólisis se hace más lenta y mejora la fidelidad (al aumentar los períodos de corrección) a expensas de reducir la velocidad de la síntesis proteica.

Guanosina 5'-*O*-(tiotrifosfato (GTPγS)



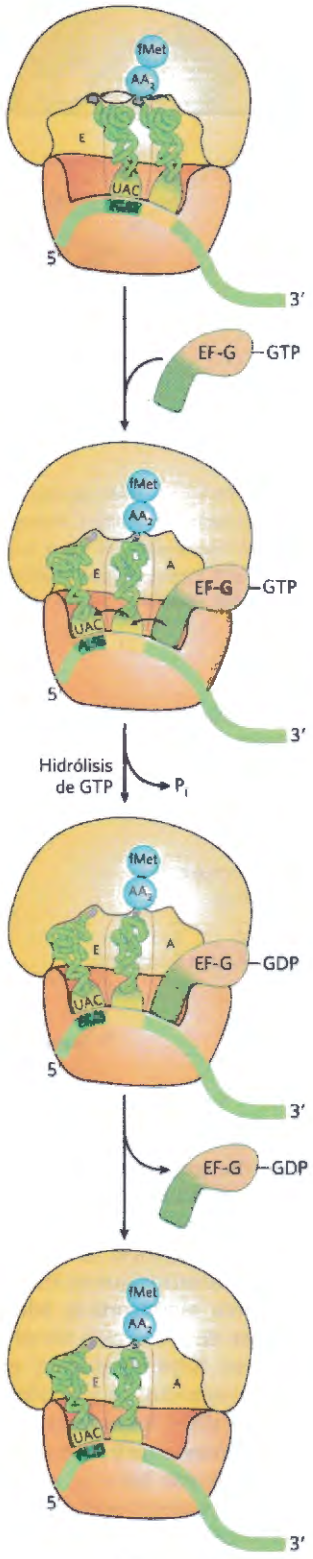
El proceso de la síntesis de proteínas (incluidas las características del apareamiento codón-anticodón ya descritas) se ha optimizado claramente a lo largo de la evolución para equilibrar los requerimientos de velocidad y fidelidad. Una mejora en la fidelidad podría disminuir la velocidad, mientras que el aumento en la velocidad probablemente sacrificaría la fidelidad. Obsérvese que el mecanismo de corrección del ribosoma solamente revisa que se haya producido el apareamiento codón-anticodón correcto. La identidad de los aminoácidos unidos a los tRNA no es revisada en el ribosoma. Si un tRNA está aminoacilado con un aminoácido incorrecto (tal como puede hacerse experimentalmente), este aminoácido incorrecto será incorporado eficientemente a la proteína, de acuerdo con el codón normalmente reconocido por el tRNA.

Etapa 4: La terminación de la síntesis de polipéptidos requiere una señal específica

La elongación continúa hasta que el ribosoma añade el último aminoácido codificado por el mRNA. La **terminación**, cuarta fase de la síntesis de polipéptidos, está señalada por la presencia de uno de los tres codones de terminación del mRNA (UAA, UAG, UGA), situado inmediatamente después del codón del último aminoácido codificado. Las mutaciones en un anticodón del tRNA que provocan la inserción de un aminoácido en un codón de terminación son generalmente deletéreas para la célula (Recuadro 27-3). En las bacterias, cuando un codón de terminación ocupa el sitio A, **tres factores de terminación** o **factores de liberación**, las proteínas RF-1, RF-2 y RF-3, contribuyen a (1) la hidrólisis del enlace peptidil-tRNA terminal; (2) la liberación del polipéptido y del último tRNA, ya descargado, del sitio P y (3) la disociación del ribosoma 70S en sus subunidades 30S y 50S, de nuevo disponibles para iniciar un nuevo ciclo de síntesis proteica **(Fig. 27-32)**. El RF-1 reconoce los codones de terminación UAG y UAA y el RF-2 reconoce UGA y UAA. Tanto RF-1 como RF-2 (según qué codón esté presente) se unen a un codón de terminación y hacen que la peptidil transferasa transfiera la cadena polipeptídica en crecimiento a una molécula de agua en lugar de a otro aminoácido. Estos factores de liberación poseen dominios que aparentemente mimetizan la estructura del tRNA, tal como se muestra para el factor de elongación EF-G en la Figura 27-31b. No se ha establecido con claridad la función específica del RF-3, aunque se supone que libera la subunidad ribosómica. En los eucariotas, un solo factor de liberación, denominado eRF, reconoce los tres codones de terminación.

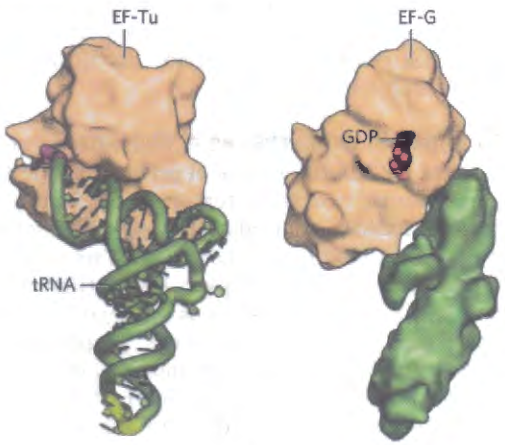
El reciclaje de los ribosomas está asociado a la disociación de los componentes de la traducción. Los factores de liberación se disocian de complejo post-terminación (con un tRNA no cargado en el sitio P) y son

COPY-STATION



(a)

FIGURA 27-31 Tercer paso de la elongación en las bacterias: translocación. **(a)** El ribosoma se traslada un codón hacia el extremo 3' del mRNA, utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del GTP unido a EF-G (translocasa). El dipeptidil-tRNA se encuentra ahora enteramente en el sitio P, dejando el sitio A libre para el aminoacil-tRNA entrante (el tercero). El tRNA descargado se disocia posteriormente del sitio E y el ciclo de elongación empieza de nuevo. **(b)** La estructura del EF-G es semejante a la estructura del EF-Tu unido al tRNA. y (derecha) EF-G unido a . La parte carboxilo-terminal del EF-G es semejante a la estructura del lazo del anticodón, tanto en forma como en distribución de carga. [Fuentes: **(b)** (izquierda) PBD ID 1823, P.Nissen et al.,*Structure* 7; 143, 1999; (derecha) PDB ID 1DAR, S. al-Karadaghi et al., *Structure* 4; 555, 1996.]



(b)

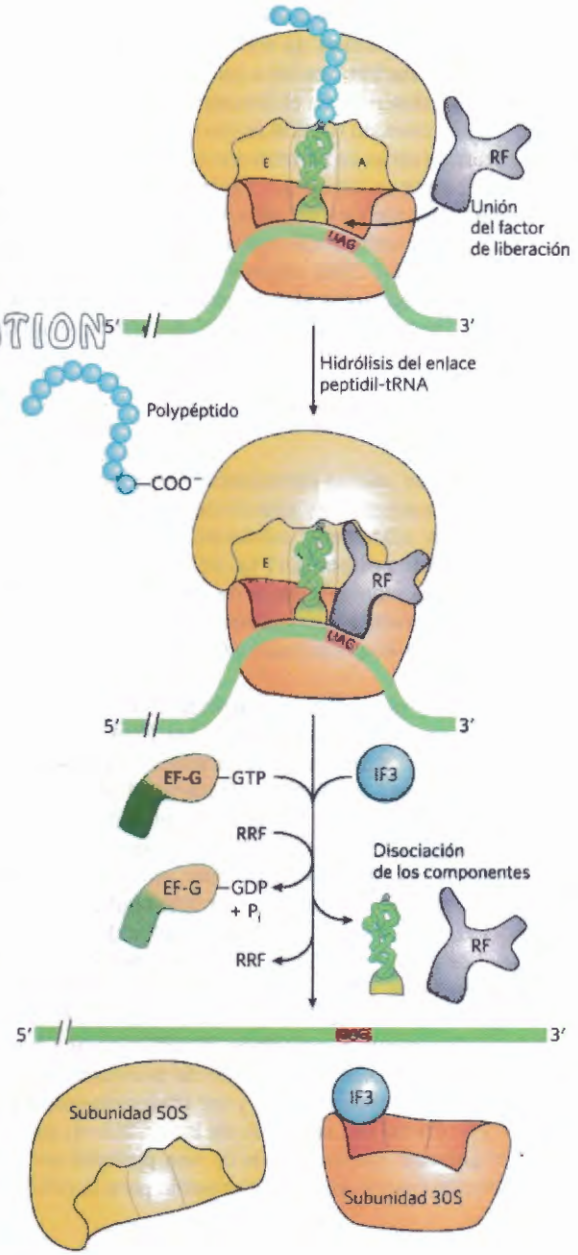
reemplazados por EF-G y una proteína denominada factor de reciclaje de ribosomas (RRF; M_r 20.300). La hidrólisis de GTP por EF-G provoca la disociación de la subunidad 50S del complejo 30S tRNA-mRNA. EGF y RRF son reemplazados por IF-3, que promueve la disociación del tRNA. El mRNA se disocia a continuación. El complejo IF-3 y la subunidad 30S están entonces en disposición de iniciar otra ronda de síntesis proteica (Fig. 27-25).

Rescate de ribosomas Los ribosomas pueden pararse durante la biosíntesis de proteínas, especialmente mientras traducen un mRNA que está dañado o incompleto. Cuando el ribosoma encuentra el final de un mRNA antes de encontrar un codón de paro, el paso de translocación mantiene la formación de un "complejo no-parada" en el cual el sitio A no tiene mRNA que puede interactuar con un tRNA cargado. El complejo no-parada no puede ser reciclado por los factores normales de terminación. En su lugar, el ribosoma es rescatado por un proceso llamado trans-translación **(Fig. 27-33)**. Practicamente en todas las bacterias, el sistema de rescate consiste en un RNA llamado RNA mensajero de transferencia (tmRNA) y una diminuta proteína, pequeña proteína B (SmpB). Esta se une al complejo parado en el cual el tmRNA es posicionado en el lugar vacío A, por lo tanto, el ribosoma puede continuar la traducción hasta que se encuentra un codón de paro unido al tmRNA. Entonces el ribosoma es reciclado, y tanto el mRNA defectuoso como el polipéptido traducido son degradados. Existen sistemas similares en eucariotas.

Coste energético de la fidelidad de la síntesis proteica La síntesis de una proteína que represente fielmente la información especificada por su mRNA requiere energía. La formación de cada aminoacil-tRNA utiliza dos grupos fosfato de alta energía. Se consume un ATP adicional cada vez que un aminoácido activado de manera incorrecta es hidrolizado por la actividad desacilante de una aminoacil-tRNA sintetasa, como parte de su actividad correctora de pruebas. Durante el primer paso de la elongación se escinde una molécula de GTP en GDP y P_i y otra durante la translocación. Por tanto, de promedio, para la formación de cada uno de los enlaces peptídicos de un polipéptido se requieren más de cuatro NTP que se hidrolizan a NDP.

Esto representa un "impulso" termodinámico sumamente grande en la dirección de la síntesis: se requieren al menos 4 x 30,5 kJ/mol = 122 kJ/mol de energía de enlace fosfodiéster para generar un enlace peptídico, que tiene una energía libre estándar de hidrólisis de sólo unos -21 kJ/mol. El cambio neto de energía libre en la síntesis del enlace peptídico es, por tanto, de -101 kJ/mol. Las proteínas son polímeros que contienen información. El objetivo bioquímico no es simplemente la formación de un enlace peptídico, sino la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos *específicos*. Cada uno de los compuestos fosfato de alta energía gastados en este proceso juega un papel determinante en el mantenimiento del alineamiento correcto entre cada nuevo codón del mRNA y su correspondiente aminoácido codificado en el extremo en crecimiento del polipéptido. Esta energía hace posible una gran fidelidad en la traducción biológica del mensaje genético del mRNA a la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

Traducción rápida de un mensaje individual por los polisomas Se pueden aislar grandes agrupamientos de 10 a 100 ribosomas, muy activos en la síntesis proteica,



COPY-STATION

FIGURA 27-32 Terminación de la síntesis de proteínas en las bacterias. La terminación tiene lugar en respuesta a un codón de terminación en el sitio A. En primer lugar, un factor de liberación, RF, se une al sitio A (RF-1 o RF-2 según qué codón de terminación esté presente). A continuación, se produce la hidrólisis del enlace éster entre el polipéptido en crecimiento y el tRNA en el sitio P y se libera el polipéptido terminado. Finalmente el mRNA, el tRNA desacilado y el factor de liberación abandonan el ribosoma, el cual se disocia en sus subunidades 30S y 50S, ayudado por el factor de reciclaje ribosómico (RRF), IF-3 y la energía es suministrada por la hidrólisis de GTP mediada por EF-G. El complejo de la subunidad 30S con IF-3 está listo para empezar un nuevo ciclo de traducción (véase la Fig. 27-25).

RECUADRO 27-3 Variación inducida en el código genético: Supresión de mutaciones

Cuando una mutación introduce un codón de terminación en el interior de un gen, la traducción se detiene prematuramente y la cadena polipeptídica incompleta es a menudo inactiva. Tales mutaciones se denominan mutaciones sin sentido. La función normal del gen puede ser restablecida si una segunda mutación (1) convierte el codón de terminación mal colocado en un codón que especifique un aminoácido o (2) suprime los efectos del codón de terminación. La segunda clase de mutaciones restauradoras se denomina **supresores sin sentido**; generalmente se trata de mutaciones en los genes del tRNA que producen tRNA alterados (supresores) que pueden reconocer el codón de terminación insertando un aminoácido en esta posición. La mayoría de los tRNA supresores tienen sustituciones de una sola base en sus anticodones.

Los tRNA supresores constituyen una variación inducida experimentalmente del código genético para permitir la lectura de codones que normalmente son de terminación, similar a las variaciones naturales del código descritas en el Recuadro 27-1. La supresión de mutaciones sin sentido no destruye completamente la transferencia de información en la célula, porque normalmente en las células hay varias copias de cada gen de tRNA; algunos de estos genes duplicados se expresan débilmente y sólo son responsables de una pequeña parte del tRNA disponible en la célula. Las mutaciones supresoras afectan normalmente a estas especies de tRNA "minoritarias", dejando que el tRNA mayoritario lea su codón normalmente.

Por ejemplo, en *E. coli* hay tres genes idénticos para el $tRNA^{Tyr}$, que producen un tRNA con el anticodón (5')GUA. Uno de ellos se expresa en niveles relativamente elevados y, por tanto, representa la especie de $tRNA^{Tyr}$ mayoritaria; los otros dos genes se transcriben solamente en pequeñas cantidades. Un cambio en el anticodón del tRNA de uno de estos genes duplicados de $tRNA^{Tyr}$, de (5')GUA a (5')CUA, produce una especie de $tRNA^{Tyr}$ minoritaria que insertará tirosina en los codones de terminación UAG. Esta inserción de tirosina en UAG es ineficiente, pero puede hacer posible la producción de suficiente proteína de la longitud adecuada a partir de un gen con una mutación sin sentido, que permita la vida de la célula. El $tRNA^{Tyr}$ mayoritario continúa traduciendo el código genético normalmente para la mayoría de proteínas.

La mutación que conduce a la creación de un tRNA supresor no ocurre siempre en el anticodón. La supresión de los codones UGA sin sentido implica generalmente al $tRNA^{Trp}$, que normalmente reconoce UGG. La alteración que le permite leer UGA (e insertar residuos de Trp en estas posiciones) es un cambio G → A en la posición 24 (en un brazo del tRNA algo separado del anticodón). Este tRNA puede ahora reconocer *tanto* UGG como UGA. Un cambio similar se encuentra en los tRNA que intervienen en la variación natural más común del código genético (UGA = Trp, véase el Recuadro 27-1).

COPY-STATION

tanto de las células eucarióticas como de las bacterianas. Las micrografías electrónicas muestran una fibra entre los ribosomas adyacentes del agrupamiento, denominado **polisoma (Fig. 27-34a)**. La hebra conectora es una molécula única de mRNA que es traducida simultáneamente por muchos ribosomas próximos unos a otros lo que permite una utilización muy eficiente del mRNA.

En las bacterias, la transcripción y la traducción están estrechamente acopladas. Los RNA mensajeros se sintetizan y se traducen en la misma dirección 5'→3'. Los ribosomas empiezan a traducir el extremo 5' del mRNA antes de que se haya completado la transcripción (Fig. 27-33b). La situación es completamente diferente en las células eucarióticas, en donde los mRNA recién transcritos han de ser transferidos fuera del núcleo antes de que puedan ser traducidos.

Los mRNA bacterianos generalmente tienen una existencia de sólo unos pocos minutos antes de ser degradados por nucleasas. Para mantener elevadas tasas de síntesis de proteínas, el mRNA de una proteína determinada, o de un conjunto de proteínas, tiene que producirse continuamente y ser traducido con la máxima eficiencia. La corta vida de los mRNA en las bacterias permite que la síntesis de una proteína cese rápidamente cuando ya no es necesaria para la célula.

Etapa 5: Plegamiento y modificación de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas

En la última fase de la síntesis de proteínas, la cadena polipeptídica naciente se pliega y se modifica para adquirir su forma biológicamente activa. Durante o después de su síntesis, la cadena polipeptídica adopta progresivamente su conformación nativa, con la formación de los puentes de hidrógeno y las interacciones de van der Waals, iónicas e hidrofóbicas apropiadas. Las proteínas chaperonas (Capítulo 4) juegan un papel importante en el plegamiento correcto de las células. . Algunas proteínas recién sintetizadas, tanto bacterianas como de arqueas o eucarióticas, no adquieren su conformación biológicamente activa definitiva hasta que han sido modificadas por una o más reacciones, denominadas **modificaciones postraducción**.

Modificaciones amino-terminales y carboxilo-terminales

El primer residuo insertado en todos los polipéptidos es *N*-formilmetionina (en las bacterias) o metionina (en los eucariotas). Sin embargo, el grupo formilo, el residuo Met amino-terminal y, a menudo, otros residuos amino-terminales (y, en algunos casos, carboxilo-terminales) pueden ser eliminados enzimáticamente en la elaboración de la proteína funcional final. En hasta el 50% de las proteínas eucarióticas, el grupo amino del residuo amino-terminal es *N*-acetilado después de la

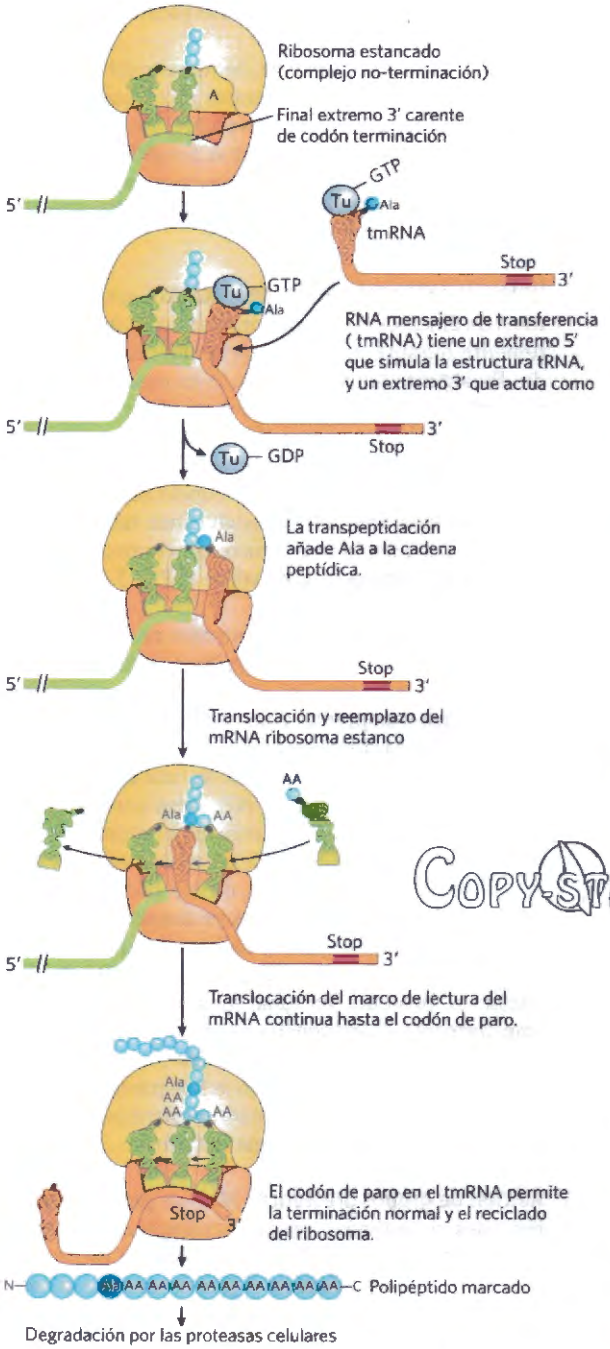


FIGURA 27-33 Rescate de ribosomas bacterianos estancados por el tmRNA. En las bacterias, el tmRNA rescata los ribosomas estancados imitando tanto el tRNA como el mRNA. La vía que se realiza en varios pasos permite la liberación y degradación del mRNA dañado y marca los segmentos polipeptídicos para la degradación.

traducción. Los residuos carboxilo-terminales también son, a veces, modificados.

Pérdida de secuencias señal Como veremos en la Sección 27.3, los 15 a 30 residuos en el extremo amino-terminal de algunas proteínas juegan un papel en dirigir la proteína a su destino final en la célula. Estas **secuencias señal** son finalmente eliminadas mediante peptidasas específicas.

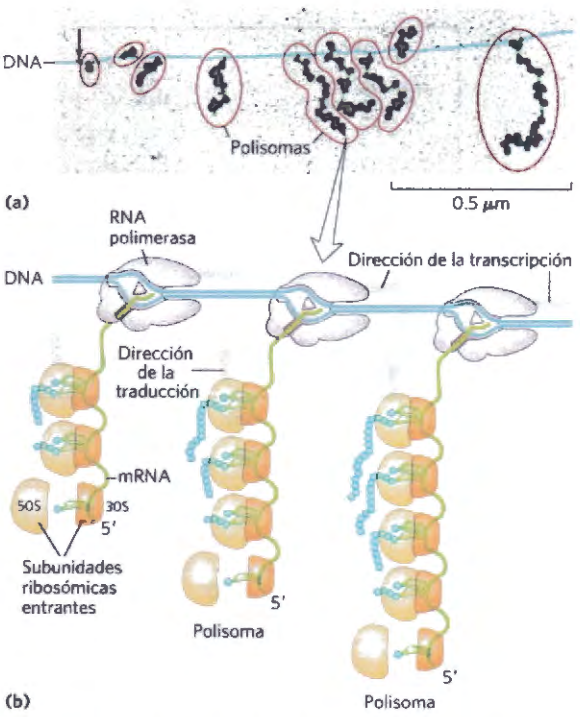
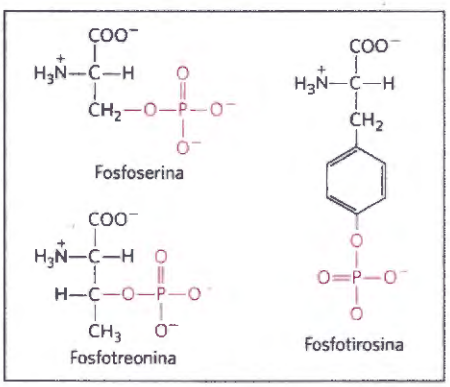


FIGURA 27-34 Acoplamiento de la transcripción y la traducción en las bacterias. (a) Micrografía electrónica de polisomas formándose durante la transcripción de un segmento de DNA de *E. coli*. Cada mRNA se traduce simultáneamente por muchos ribosomas. Las cadenas polipeptídicas nacientes que se forman en los ribosomas son difíciles de ver en las condiciones de preparación utilizadas para preparar las muestras mostradas en estas micrografías. La flecha señala el principio aproximado del gen que se está transcribiendo. **(b)** Cada mRNA es traducido por los ribosomas cuando todavía está siendo transcrito a partir del DNA por la RNA polimerasa. Ello es posible porque el mRNA en las bacterias no ha de ser transportado desde el núcleo al citoplasma antes de encontrarse con los ribosomas. En este diagrama esquemático los ribosomas están representados con un tamaño menor que la RNA polimerasa. En realidad, los ribosomas (M_r 2,7 x 10^6) son un orden de magnitud mayores que la RNA polimerasa (M_r 3,9 x 10^5). [Fuente: **(a)** O.L. Miller, Jr.,et al. *Science 169;392, 1970.* Fig 3 © 1970 American Association for the Advancement of Science.]

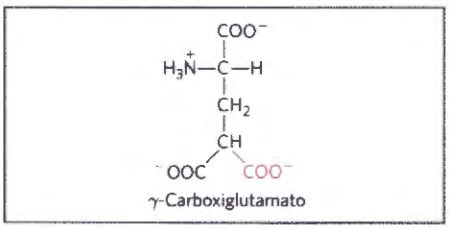
Modificación de aminoácidos concretos Los grupos hidroxilo de ciertos residuos Ser, Thr y Tyr de algunas proteínas son fosforilados enzimáticamente por ATP **(Fig. 27-35a)**; los grupos fosfato añaden cargas negativas a estos polipéptidos. El significado funcional de esta modificación depende de la proteína. Por ejemplo, la caseína de la leche tiene muchos grupos fosfoserina que fijan Ca^{2+}. El calcio, el fosfato y los aminoácidos son todos ellos nutrientes esenciales para los lactantes; así pues, la caseína proporciona eficientemente tres nutrientes esenciales. Como hemos visto en numerosas ocasiones, los ciclos de fosforilación-desfosforilación regulan la actividad de muchos enzimas y proteínas reguladoras.

Se pueden añadir grupos carboxilo adicionales a los residuos de Glu de algunas proteínas. Por ejemplo, la protrombina, proteína de la coagulación de la sangre, contiene varios residuos de γ-carboxiglutamato (Fig. 27-35b) en su región amino-terminal, introducidos por un enzima que requiere vitamina K. Estos grupos car-

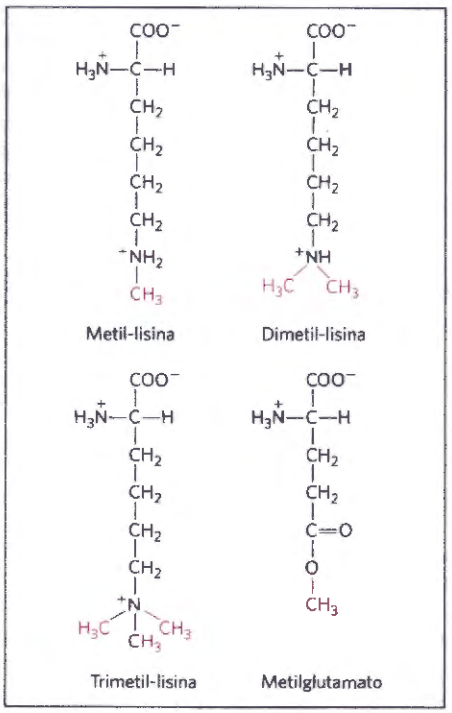
COPY-STATION



(a)



(b)



(c)

FIGURA 27-35 Algunos residuos aminoácidos modificados. **(a)** Aminoácidos fosforilados. **(b)** Un aminoácido carboxilado. **(c)** Algunos aminoácidos metilados.

boxilo fijan Ca^{2+}, que es necesario para iniciar el mecanismo de coagulación.

Se encuentran residuos de monometil- y de dimetil-lisina (Fig. 27-35c) en algunas proteínas musculares y en el citocromo *c*. La calmodulina de la mayoría de organismos contiene un residuo trimetil-lisina en una posición específica. En otras proteínas, la metilación de los grupos carboxilo de algunos residuos Glu elimina su carga negativa.

Unión de cadenas laterales de glúcidos Las cadenas laterales de glúcidos de las glucoproteínas se unen covalentemente durante o después de la síntesis del polipéptido. En algunas glucoproteínas, la cadena lateral de glúcido se une enzimáticamente a residuos Asn (oligosacáridos unidos por enlace *N*), en otras a residuos Ser o Thr (oligosacáridos unido por enlace *O*) (véase la Fig. 7-30). Muchas proteínas que funcionan extracelularmente, al igual que los proteoglucanos lubricantes que revisten las membranas mucosas, contienen cadenas laterales de oligosacáridos (véase la Fig. 7-28).

Adición de grupos isoprenilo Diversas proteínas eucarióticas están modificadas con grupos derivados del isopreno (grupos isoprenilo). Se forma un enlace tioéter entre el grupo isoprenilo y un residuo Cys de la proteína (véase la Fig. 11-13). Los grupos isoprenilo proceden de intermedios pirofosforilados de la ruta biosintética del colesterol (véase la Fig. 21-35), tales como el farnesil pirofosfato **(Fig. 27-36)**. Entre las proteínas modificadas de esta forma se cuentan las proteínas Ras (proteínas G pequeñas), productos de los oncogenes y proto-oncogenes *ras* así como las proteínas G (ambas discutidas en el Capítulo 12) y las laminas, que se encuentran en la matriz nuclear. El grupo isoprenilo sirve para anclar la proteína en una membrana. La actividad transformante (carcinogénica) del oncogén *ras* se pierde cuando se bloquea la isoprenilación de la proteína Ras, hecho que ha estimulado la búsqueda de inhibidores de esta ruta de modificación postraducción para su utilización en la quimioterapia del cáncer.

COPY-SEARCH

Adición de grupos prostéticos Muchas proteínas requieren para su actividad grupos prostéticos unidos covalentemente. Dos ejemplos son la molécula de biotina de la acetil-CoA carboxiliasa y el grupo hemo de la hemoglobina o del citocromo *c*.

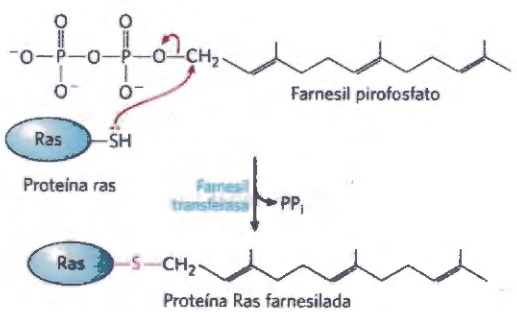


FIGURA 27-36 Farnesilación de un residuo Cys. El enlace tioéter se muestra en rojo. La proteína Ras es el producto del oncogén *ras*.

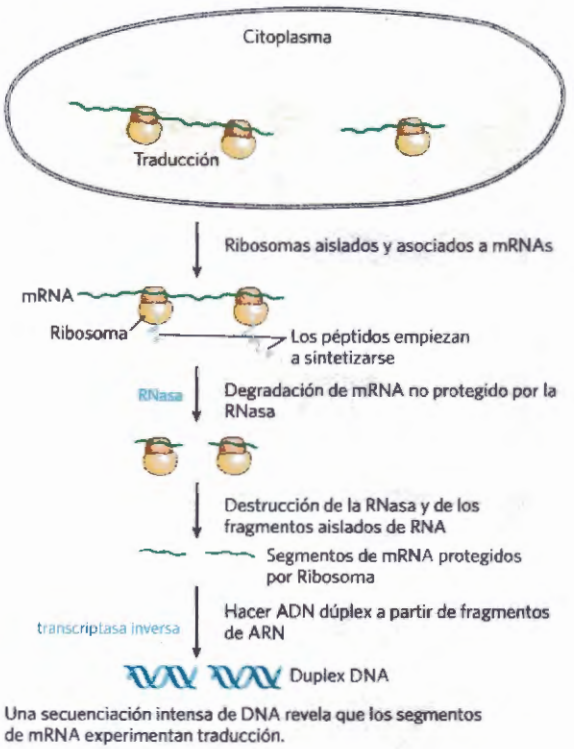


FIGURA 27-37 Perfil Ribosomal. Esta técnica utiliza los nuevos métodos de secuenciación de DNA para determinar los mRNAs en una célula que ha sido traducida en un momento determinado. Después que los ribosomas i los RNA asociados se aíslan, las ribonucleasas eliminan todo el RNA que no está unido y protegido por los ribosomas. Los segmentos de RNA que están protegidos son separados de los ribosomas y convertidos por la transcriptasa inversa en DNA, y el DNA es sometido a una secuenciación intensa.

Modificación proteolítica Muchas proteínas se sintetizan inicialmente como grandes polipéptidos precursores inactivos, que son recortados proteolíticamente para dar sus formas activas, más pequeñas. Algunos ejemplos son la insulina, algunas proteínas víricas y proteasas tales como el quimotripsinógeno y el tripsinógeno (véase la Fig. 6-39).

Formación de puentes disulfuro Algunas proteínas, después de plegarse en su conformación nativa, forman puentes disulfuro inter- o intracatenarios entre residuos Cys. Los puentes disulfuro son comunes en las proteínas eucarióticas destinadas a la exportación. Los entrecruzamientos formados de este modo ayudan a proteger la conformación nativa de la molécula de proteína de la desnaturalización en el medio extracelular, que puede diferir significativamente de las condiciones intracelulares y que es, generalmente, oxidante.

El perfil ribosomal proporciona una instantánea de la traducción celular

Los nuevos métodos de secuenciación del DNA pueden ser aplicados en varias vías y permiten a los investigadores estudiar las vías de información. Una de las aplicaciones, llamada **perfil ribosomal,** identifica las secuencias de mRNA que empiezan a ser traducidas en un determinado momento en la célula. **(Fig. 27-37).** Los investigadores cultivan las células o los tejidos y rápidamente aíslan los ribosomas con su unión al mRNAs. Las ribonucleasas se utilizan para eliminar cualquier RNA que no esté unido a los ribosomas y el RNA unido y protegido por los ribosomas es aislado. Este RNA se convierte en DNA por la trancriptasa inversa (ver capítulo 26), por lo tanto sujeta a una secuenciación profunda (p. 310) . No solo las secuencias resultantes revelan las partes de genes que están siendo traducidos en un momento determinado, sino que el número relativo de lecturas de cada segmento que está siendo traducido. Por ejemplo, las ocho diferentes subunidades de la F_0F_1-ATPasa bacteriana(Ver Fig 19-25) son codificadas en un operón simple y traducido de un simple, policistrónico mRNA. Podemos asumir, entonces, que todas las subunidades de proteínas, traducidas desde su mRNA, podrían ser sintetizadas en niveles semejantes. Pero las subunidades no están presentes en igual número en el complejo final; la F_0F_1-ATPasa bacteriana tiene 10 subunidades c, 3 de subunidades α y β, y 1 o 2 de otras unidades. El perfil ribosomal muestra que ocho genes dentro del mRNA son traducidos en el ratio 1:1:1:1:2:3:3:10. La traducción de genes individuales es para traducir las cantidades de cada subunidad que corresponde precisamente a los ratios de subunidades en el complejo final. Resultados similares se han obtenido en distintos complejos de proteínas macromoleculares en diversos organismos.

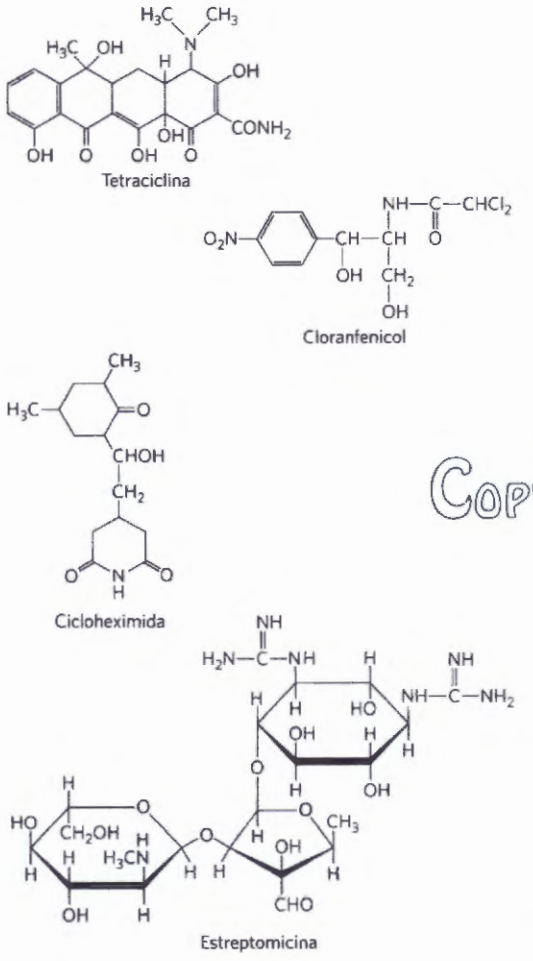
La síntesis de proteínas es inhibida por muchos antibióticos y toxinas

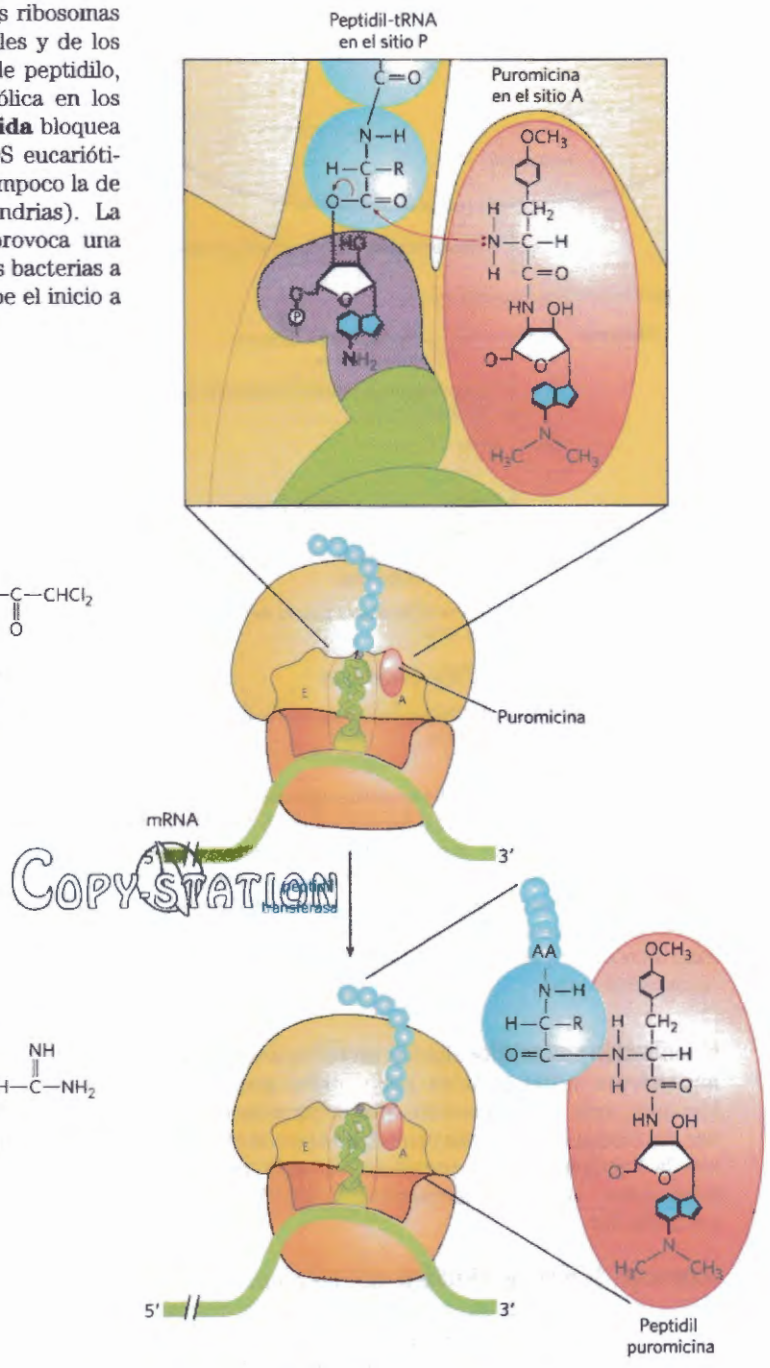
La síntesis de proteínas es una función central en la fisiología celular y es una de las principales dianas de muchos antibióticos y toxinas naturales. Excepto en los casos especificados, estos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias. Las diferencias entre la síntesis de proteínas bacteriana y eucariótica aunque sutiles son suficientes para que la mayoría de estos compuestos sean relativamente inocuos para las células eucarióticas. La selección natural ha favorecido la evolución de compuestos que explotan estas pequeñas diferencias para actuar selectivamente sobre los sistemas bacterianos de tal modo que estas armas bioquímicas son sintetizadas por algunos microorganismos y son extremadamente tóxicas para otros. Los antibióticos son herramientas muy valiosas en el estudio de la síntesis de proteínas, pues casi cada paso de la síntesis de proteínas puede ser inhibido específicamente por uno u otro antibiótico.

Uno de los antibióticos inhibidores mejor conocidos es la **puromicina**, producido por el hongo *Streptomyces alboniger*. Su estructura, muy similar al extremo 3' de un aminoacil-tRNA, le permite fijarse al sitio A del ribosoma y participar en la formación del enlace peptídico, produciendo peptidil-puromicina **(Fig. 27-38)**. Sin embargo, puesto que la puromicina se parece solamente al extremo 3' del tRNA, no participa en la translocación y se disocia del ribosoma poco después de haberse unido al extremo carboxilo del péptido, con lo cual termina prematuramente la síntesis del polipéptido.

Las **tetraciclinas** inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias al bloquear el sitio A del ribosoma, impidiendo así la unión de los aminoacil-tRNA. El **cloranfe-**

nicol inhibe la síntesis de proteínas por los ribosomas bacterianos (y también en los mitocondriales y de los cloroplastos) al bloquear la transferencia de peptidilo, pero sin afectar la síntesis proteica citosólica en los eucariotas. Por el contrario, la **cicloheximida** bloquea la peptidil transferasa de los ribosomas 80S eucarióticos, pero no la de los 70S bacterianos (y tampoco la de los ribosomas de cloroplastos y mitocondrias). La **estreptomicina**, un trisacárido básico, provoca una lectura incorrecta del código genético en las bacterias a concentraciones relativamente bajas e inhibe el inicio a concentraciones más elevadas.





COPY-STATION

Otros inhibidores de la síntesis de proteínas son destacables por su toxicidad para el hombre y otros mamíferos. La **toxina diftérica** (M_r 58.330) cataliza la ADP-ribosilación de un residuo de diftamida (una histidina modificada) del factor de elongación eucariótico eEF2, inactivándolo. La **ricina** (M_r 29.895), una proteína extremadamente tóxica obtenida del ricino, inactiva la subunidad 60S de los ribosomas eucarióticos al despurinar una adenosina específica del rRNA 23S. La ricina se utilizó en el asesinato del periodista de la BBC, y disidente búlgaro, Georgi Markov, presumiblemente por la policía secreta búlgara. Utilizando una jeringa escondida en el extremo de un paraguas, un miembro de la policía secreta inyectó a Markov en la pierna una dosis de ricina. Murió a los cuatro días.

FIGURA 27-38 Terminación prematura de la formación de enlaces peptídicos por la puromicina. El antibiótico puromicina se parece al extremo aminoacilo de un tRNA cargado, pudiendo fijarse al sitio A del ribosoma y participar en la formación de un enlace peptídico. El producto de esta reacción, peptidil puromicina, en lugar de ser translocado al sitio P, se disocia del ribosoma, provocando la terminación prematura de la cadena.

RESUMEN 27.2 Síntesis de proteínas

■ La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas, que están formados por proteína y rRNA. Las bacterias tienen ribosomas 70S, con una subunidad grande (50S) y una pequeña (30S). Los ribosomas eucarióticos son significativamente mayores (80S) y contienen más proteínas.

- Los RNA de transferencia tienen de 73 a 93 residuos nucleóticos, algunos con las bases modificadas. Cada tRNA tiene un brazo del aminoácido con la secuencia terminal CCA(3') con la cual se esterifica un aminoácido, un brazo del anticodón, un brazo TψC y un brazo D; algunos tRNA tienen un quinto brazo. El anticodón es responsable de la especificidad de la interacción entre el aminoacil-tRNA y el codón complementario en el mRNA.
- El crecimiento de los polipéptidos en los ribosomas empieza con el aminoácido amino-terminal y avanza por adición sucesiva de nuevos residuos al extremo carboxilo-terminal.
- La síntesis proteica tiene lugar en cinco fases.
  1. Los aminoácidos se activan en el citosol por aminoacil-tRNA sintetasas. Estos enzimas catalizan la formación de aminoacil-tRNA, asociada a la hidrólisis del ATP a AMP y PPi. La fidelidad de la síntesis proteica depende de la precisión de esta reacción y algunos de estos enzimas son capaces de realizar corrección de pruebas en sitios activos independientes.
  2. En las bacterias, el aminoacil-tRNA iniciador de todas las proteínas es el *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$. El inicio de la síntesis proteica comporta la formación de un complejo entre la subunidad ribosómica 30S, mRNA, GTP, fMet-$tRNA^{fMet}$, tres factores de inicio y la subunidad 50S; el GTP se hidroliza a GDP y P_i.
  3. En las etapas de elongación se necesitan GTP y factores de elongación para la unión del aminoacil-tRNA entrante al sitio A del ribosoma. En la primera reacción de transferencia de peptidilo, el residuo fMet se transfiere al grupo amino del aminoacil-tRNA entrante. A continuación, el movimiento del ribosoma a lo largo del mRNA transloca el dipeptidil-tRNA del sitio A al sitio P en un proceso que requiere hidrólisis de GTP. Los tRNA desacilados se disocian del sitio E del ribosoma.
  4. Después de muchos ciclos de elongación semejantes, la síntesis del polipéptido termina con la ayuda de factores de liberación. Se necesitan al menos cuatro equivalentes de fosfato de alta energía (procedentes del ATP y el GTP) para formar cada enlace peptídico, inversión energética necesaria para garantizar la fidelidad de la traducción.
  5. Los polipéptidos se pliegan en sus formas activas tridimensionales. Muchas proteínas son modificadas ulteriormente mediante reacciones postraducción.
- El perfil ribosomal permite a los investigadores a determinar que secuencias génicas han sido traducidas en un momento determinado.
- Muchos antibióticos y toxinas bien estudiados inhiben algún aspecto de la síntesis proteica.

27.3 Destino y degradación de las proteínas

La célula eucariótica consta de muchas estructuras, compartimientos y orgánulos con funciones específicas que requieren conjuntos distintos de proteínas y enzimas. Estas proteínas (con excepción de las producidas en las mitocondrias y los plastidios) se sintetizan en los ribosomas del citosol, ¿cómo, pues, alcanzan sus destinos celulares finales?

Estamos empezando a comprender este complejo y fascinante fenómeno. Las proteínas destinadas a la secreción, la integración en la membrana plasmática o la integración en los lisosomas comparten, generalmente, los primeros pasos de una ruta de transporte que empieza en el retículo endoplasmático. Las proteínas destinadas a las mitocondrias, cloroplastos o núcleo utilizan tres mecanismos distintos, mientras que las proteínas destinadas al citosol permanecen en el lugar donde han sido sintetizadas.

El elemento más importante en muchas de estas rutas de destino es una corta secuencia de aminoácidos denominada **secuencia señal**, cuya función fue postulada por primera vez por Günter Blobel y colaboradores en 1970. La secuencia señal dirige la proteína hacia su localización apropiada en la célula y, a menudo, se elimina durante el transporte o después de que la proteína haya alcanzado su destino final. En las proteínas destinadas a las mitocondrias, los cloroplastos o el RE, la secuencia señal se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido recién sintetizado. En muchos casos, se ha podido confirmar la capacidad de direccionamiento de ciertas secuencias señal, fusionando la secuencia señal de una proteína con una segunda proteína; la señal dirige la segunda proteína a la localización donde normalmente se encuentra la primera proteína. La degradación selectiva de las proteínas que ya no se necesitan en la célula también depende en gran medida de un conjunto de señales moleculares integradas en la estructura de cada proteína.



Günter Blobel
[Fuente: Cortesía de Günter Blobel, The Rockefeller University.]

La sección final de este capítulo esta dedicada a los procesos de destino y degradación, con especial énfasis en las señales y en la regulación molecular que se encuentran en la base de estos procesos tan cruciales para el metabolismo celular. Salvo indicación contraria, nos centraremos en las células eucarióticas.

La modificación postraducción de muchas proteínas eucarióticas empieza en el retículo endoplasmático

El sistema de direccionamiento posiblemente mejor caracterizado empieza en el RE. La mayoría de proteínas lisosómicas, de membrana o secretadas tienen una secuencia amino-terminal que las marca para su translocación a la luz del RE **(Fig. 27-39)**; se han identificado centenares de estas secuencias señal. El extremo carboxilo de la secuencia señal está definido por un sitio de corte de una proteasa que elimina la secuencia señal una vez la proteína ha sido importada al RE. Las secuencias señal tienen longitudes que varían entre 13 y 36 aminoácidos, pero todas tienen en común las siguientes características: (1) entre 10 y 15 aminoácidos hidrofóbicos, (2) uno o más residuos cargados positivamente, normalmente cerca del extremo amino-terminal y por

delante de la secuencia hidrofóbica y (3) una secuencia corta en el extremo carboxilo (cerca del sitio de corte) que es relativamente polar, con aminoácidos de cadena corta (especialmente Ala) en las posiciones más cercanas al sitio de corte.

Tal como demostró originalmente George Palade, las proteínas que tienen estas secuencias señal se sintetizan en ribosomas unidos al RE. La propia secuencia señal dirige el ribosoma al RE ayuda a dirigir el ribosoma al RE, tal como ilustran los pasos del ❶ al ❽ de la **Figura 27-40**. ❶ La ruta de direccionamiento empieza con el inicio de la síntesis proteica en ribosomas libres.

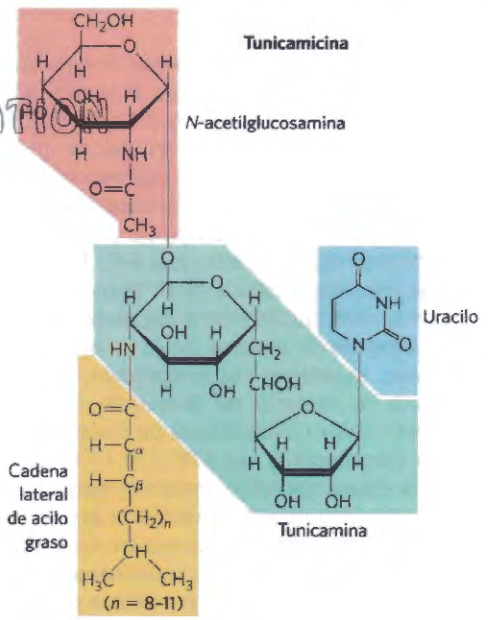


George Palade, 1912-2008
[Fuente: AP Photo.]

❷ La secuencia señal aparece pronto en el proceso de síntesis, ya que se encuentra en el extremo amino-terminal, que, tal como hemos visto, se sintetiza primero. ❸ A medida que emerge del ribosoma, la secuencia señal –y el propio ribosoma–, se unen a una gran **partícula de reconocimiento de la señal (SRP)**; a continuación la SRP une GTP y detiene la elongación del polipéptido cuando alcanza unos 70 aminoácidos y la secuencia señal ha emergido completamente del ribosoma. ❹ La SRP ligada a GTP dirige ahora el ribosoma (todavía unido al mRNA) y el polipéptido incompleto a receptores de la SRP ligada a GTP de la cara citosólica del RE; el polipéptido en curso de crecimiento es transferido a un **complejo de translocación de péptidos** en el RE, que posiblemente interaccione directamente con el ribosoma. ❺ La SRP se disocia del ribosoma y a la vez se hidroliza el GTP, tanto en la SRP como en su receptor. ❻ A continuación, se reanuda la síntesis del polipéptido, mientras que el complejo de translocación, impulsado por ATP, va introduciendo el polipéptido en crecimiento dentro de la luz del RE hasta la finalización de la síntesis de la proteína. ❼ La secuencia señal se elimina mediante una peptidasa señal dentro de la luz del RE. Finalmente, el ribosoma se disocia ❽ y recicla ❾.

La glucosilación juega un papel clave en el destino de las proteínas

Las proteínas recién sintetizadas son ulteriormente modificadas en la luz del RE de diversas maneras. Después de la eliminación de las secuencias señal, los polipéptidos se pliegan, se forman los puentes disulfuro y muchas proteínas se glucosilan para formar glucoproteínas. En muchas glucoproteínas, la unión con los oligosacáridos es a través de residuos Asn. Estos oligosacáridos unidos por enlaces *N* son muy variados (Capítulo 7), pero sus rutas de formación tienen un primer paso común. Se sintetiza paso a paso un oligosacárido núcleo de 14 residuos que después se transfiere desde una molécula dadora de dolicol fosfato a ciertos residuos Asn de la proteína **(Fig. 27-41)**. La transferasa se encuentra en la cara interior del RE y, por tanto, no puede catalizar la glucosilación de las proteínas citosólicas. Después de la transferencia, el oligosacárido núcleo se recorta y elabora de distintas formas en las diferentes proteínas, pero todos los oligosacáridos unidos por enlace *N* conservan un núcleo pentasacárido derivado del oligosacárido original de 14 residuos. Varios antibióticos actúan interfiriendo con uno o más pasos de este proceso y han sido de utilidad en el estudio de los pasos implicados en la glucosilación de proteínas. El mejor caracterizado es la **tunicamicina**, que guarda un gran parecido con la estructura de la UDP-*N*-acetilglucosamina y bloquea el primer paso del proceso (Fig. 27-41, paso ❶). Algunas proteínas están *O*-glucosiladas, pero la mayor parte de la *O*-glucosilación tiene lugar en el complejo de Golgi o en el citosol (para proteínas que no entran en el RE).



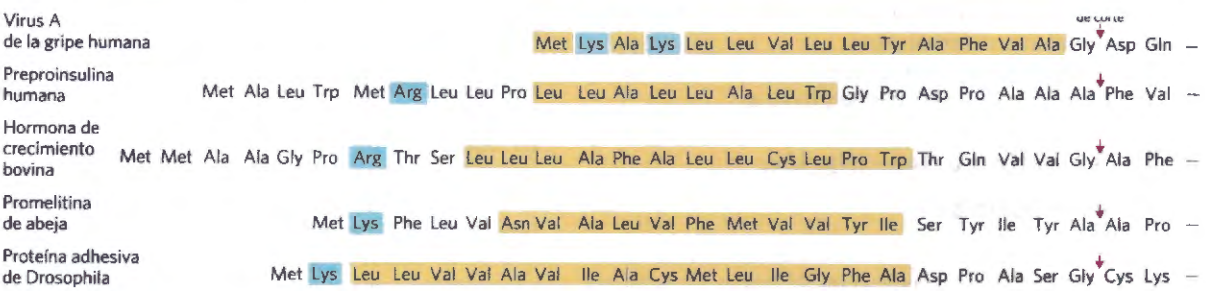


FIGURA 27-39 Secuencias señal amino-terminales de algunas proteínas eucarióticas que dirigen la translocación al RE. El núcleo hidrofóbico (amarillo) está precedido por uno o más residuos básicos (azul). Obsérvese la presencia de residuos polares y de cadena lateral corta inmediatamente antes (a la izquierda tal como se muestra aquí) de los sitios de corte (indicados por flechas rojas).

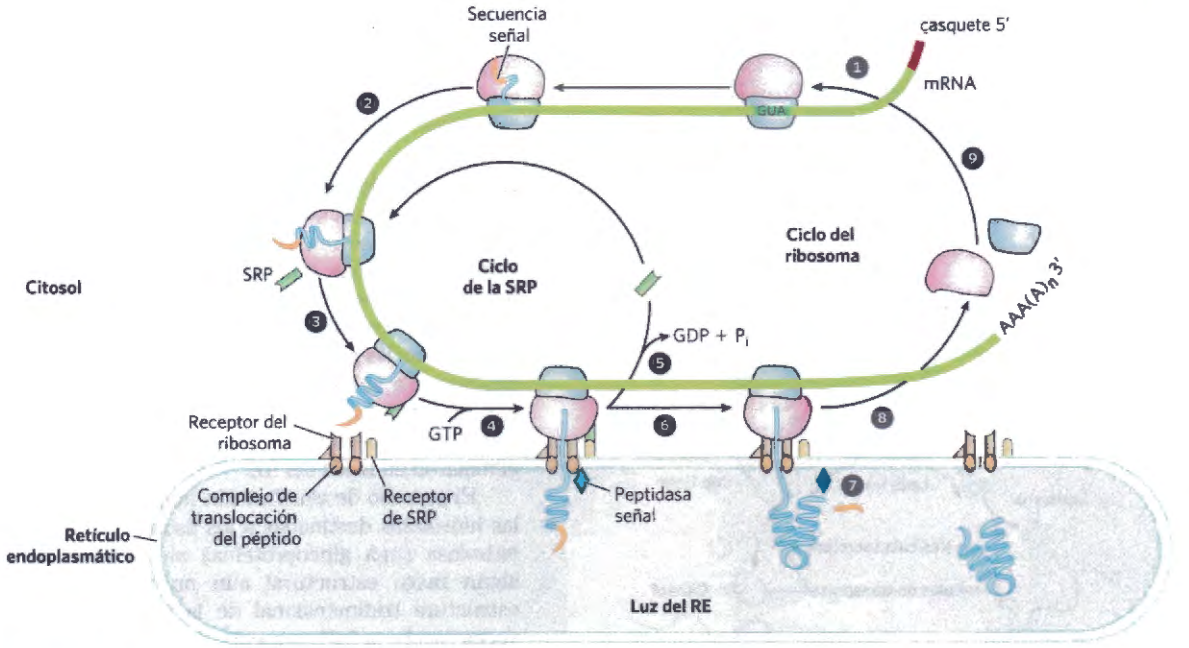


FIGURA 27-40 Envío de proteínas eucarióticas mediante señales apropiadas al retículo endoplasmático. Este proceso incluye el ciclo de la SRP y la translocación y corte del polipéptido en crecimiento. Las diferentes etapas se describen en el texto. La SRP es un complejo en forma de varilla que contiene un RNA de 300 nucleótidos (denominado 7SL-RNA) y seis proteínas diferentes (con una M_r combinada de 325.000). Una subunidad proteica de la SRP se une directamente a la secuencia señal, inhibiendo la elongación por bloqueo estérico de la entrada de los aminoacil-tRNA e inhibición de la peptidil transferasa. Otra subunidad proteica une e hidroliza GTP. El receptor de la SRP es un heterodímero de subunidades α (M_r 69.000) y β (M_r 30.000), en el que ambas subunidades hidrolizan GTP durante el proceso.

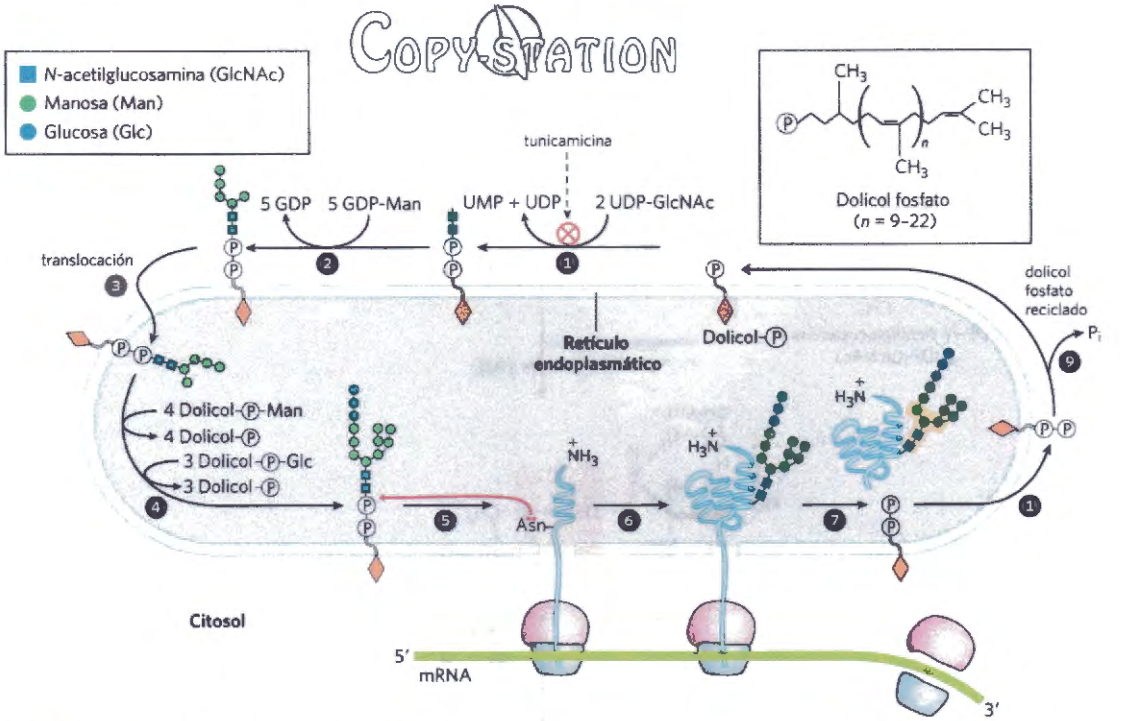


FIGURA 27-41 Síntesis del oligosacárido núcleo de las glucoproteínas. El oligosacárido núcleo se forma por adición sucesiva de unidades de monosacárido. ❶, ❷ Los primeros pasos tienen lugar en la cara citosólica del RE. ❸ La translocación desplaza el oligosacárido incompleto a través de la membrana (mecanismo no mostrado) y ❹ la finalización del oligosacárido núcleo tiene lugar dentro de la luz del RE. Los precursores que aportan residuos de manosa y glucosa adicionales al oligosacárido en formación en la luz del RE son derivados del dolicol fosfato. En el primer paso de la formación de los oligosacáridos de las glucoproteínas unidos por enlace *N*, , el oligosacárido núcleo ❺, ❻ se transfiere desde el dolicol fosfato a un residuo Asn de la proteína en la luz del RE. El oligosacárido núcleo se modifica ulteriormente en el RE y en el complejo de Golgi, en rutas que difieren según las distintas proteínas. Los cinco residuos glucídicos sobre fondo beige (después del paso ❼) persisten en la estructura final de todos los oligosacáridos unidos por enlace *N*. ❽ El dolicol pirofosfato liberado se transloca de nuevo, de forma que el pirofosfato vuelve a encontrarse en la cara citosólica del RE; finalmente , ❾ se elimina un fosfato por hidrólisis con lo que se regenera el dolicol fosfato.

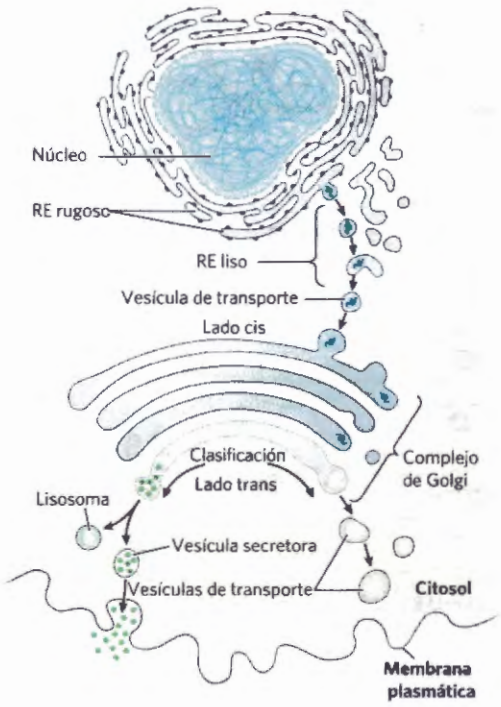


FIGURA 27-42 Ruta seguida por las proteínas destinadas a los lisosomas, la membrana plasmática o la secreción. Las proteínas se desplazan desde el RE al lado cis del complejo de Golgi en vesículas de transporte. La clasificación tiene lugar principalmente en el lado trans del complejo de Golgi.

A continuación, las proteínas adecuadamente modificadas pueden ser transportadas hasta diversos destinos celulares. Las proteínas se desplazan desde el RE al complejo de Golgi en vesículas de transporte **(Fig. 27-42)**.

En el complejo de Golgi se añaden los oligosacáridos unidos a proteínas por enlace *O*, mientras que los unidos por enlace *N* sufren modificaciones adicionales. En el complejo de Golgi también se clasifican las proteínas, mediante mecanismos todavía no aclarados por completo, para ser enviadas a sus destinos finales. Los procesos que separan las proteínas destinadas a la secreción de las destinadas a la membrana plasmática o a los lisosomas han de distinguir las proteínas sobre la base de rasgos estructurales distintos de las secuencias señal, que ya se eliminaron en la luz del RE.

El proceso de clasificación mejor conocido es el de las hidrolasas destinadas a los lisosomas. Al llegar una hidrolasa (una glucoproteína) al complejo de Golgi, algún rasgo estructural aún no determinado de la estructura tridimensional de la hidrolasa (llamado a veces parche señal) es reconocido por una fosfotransferasa que fosforila ciertos residuos manosa del oligosacárido **(Fig. 27-43)**. La presencia de uno o varios residuos de manosa 6-fosfato en sus oligosacáridos unidos por enlace *N* es la señal estructural que dirige la proteína a los lisosomas. Una proteína receptora en la membrana del complejo de Golgi reconoce la señal manosa 6-fosfato y une las hidrolasas marcadas de este modo. Las vesículas que contienen estos complejos recep-

COPY-STATION

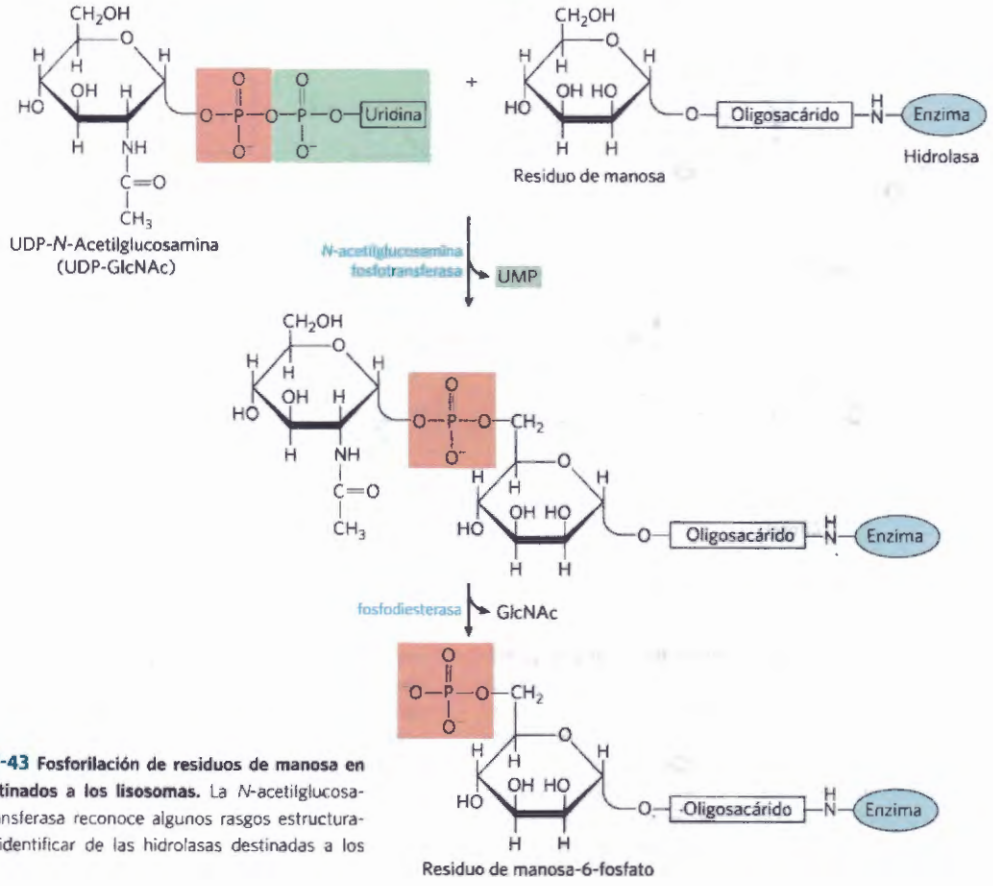


FIGURA 27-43 Fosforilación de residuos de manosa en enzimas destinados a los lisosomas. La *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa reconoce algunos rasgos estructurales aún por identificar de las hidrolasas destinadas a los lisosomas.

tor-hidrolasa producen una gemación en el lado trans del complejo de Golgi y se abren camino hasta vesículas clasificadoras. Aquí se disocian los complejos receptor-hidrolasa en un proceso que está facilitado por el pH más bajo de las vesículas clasificadoras y por la eliminación de grupos fosfato de los residuos manosa-6-fosfato, catalizada por una fosfatasa. A continuación, el receptor se recicla en el complejo de Golgi y las vesículas que contienen las hidrolasas se separan por gemación de las vesículas clasificadoras y se trasladan hacia los lisosomas. En las células tratadas con tunicamicina (Fig. 27-41, paso ❶), las hidrolasas normalmente destinadas a los lisosomas son secretadas, lo que confirma que los oligosacáridos unidos por enlace *N* juegan un papel clave en dirigir estos enzimas a los lisosomas.

Las rutas que dirigen las proteínas a las mitocondrias o a los cloroplastos se basan en secuencias señal amino-terminales. Aunque las mitocondrias y los cloroplastos contienen DNA, la mayoría de sus proteínas están codificadas por DNA nuclear y deben ser dirigidas al orgánulo apropiado. Sin embargo, a diferencia de otras rutas de destino, las rutas de mitocondrias y cloroplastos empiezan sólo *después* de que la proteína precursora haya sido completamente sintetizada y liberada del ribosoma. Las proteínas precursoras destinadas a las mitocondrias o a los cloroplastos se unen a chaperonas citosólicas y se transfieren a receptores de la superficie exterior del orgánulo diana. A continuación, mecanismos de translocación especializados transportan la proteína hasta su destino final en el orgánulo y, una vez alcanzado, se elimina la secuencia señal.

COPY-STATION

Las secuencias señal para el transporte nuclear no son cortadas

La comunicación molecular entre el núcleo y el citosol requiere el movimiento de macromoléculas a través de poros nucleares. Las moléculas de RNA sintetizadas en el núcleo se exportan al citoplasma. Las proteínas ribosómicas sintetizadas en los ribosomas citosólicos son importadas por el núcleo y forman en el nucleolo las subunidades ribosómicas 60S y 40S que, una vez completadas, se exportan de nuevo al citosol. Una gran variedad de proteínas nucleares (RNA y DNA polimerasas, histonas, topoisomerasas, proteínas reguladoras de la expresión génica, y muchas otras) se sintetizan en el citosol y se importan por el núcleo. Este tráfico viene modulado por un complejo sistema de señales moleculares y proteínas de transporte que poco a poco va siendo desvelado.

En la mayoría de eucariotas pluricelulares, la envoltura nuclear se desorganiza en cada división celular y una vez finalizada la división celular y restablecida la envoltura nuclear, las proteínas nucleares dispersadas deben ser reimportadas. Para hacer posible la importación nuclear reiterada, la secuencia señal que dirige una proteína al núcleo, **la secuencia de localización uuclear, NLS,** no es eliminada una vez la proteína ha alcanzado su destino. A diferencia de otras secuencias señal, una NLS puede encontrarse en casi cualquier posición de la secuencia primaria de la proteína. Las NLS son muy variables, pero muchas consisten en cuatro a ocho residuos aminoácidos y contienen varios residuos básicos (Arg o Lys) consecutivos.

La importación en el núcleo está facilitada por un conjunto de proteínas que establecen un ciclo entre el citosol y el núcleo **(Fig. 27-44)**. Entre ellas se encuentran las importinas α y β y una pequeña GTPasa denominada Ran (proteína nuclear relacionada con *Ras*). Un heterodímero de importina α y β actúa de receptor soluble para las proteínas destinadas al núcleo, en el que la subunidad α se une a las proteínas del citosol que poseen la secuencia NLS. El complejo de la proteína con la secuencia NLS y la importina se une a un poro nuclear y se transloca a través del poro mediante un mecanismo dependiente de energía. En el núcleo, la importina β se une a la GTPasa Ran y la proteína importada se disocia de la importina β. La importina β se une a Ran y CAS (proteína celular de susceptibilidad a la apoptosis) y se separa de la proteína portadora de la NLS. Las importinas α y β se exportan entonces fuera del núcleo. Ran hidroliza GTP en el citosol para liberar las importinas, que pueden iniciar ahora otro ciclo de importación. La propia Ran se recicla de nuevo en el núcleo a través de la unión de Ran-GDP al factor 2 de transporte nuclear (NTF2). Dentro del núcleo, el GDP unido a Ran es reemplazado por GTP mediante la actividad del factor Ran de intercambio de nucleótido de guanosina (RanGEF; véase el Recuadro 12-1).

Durante la mitosis, cuando el envoltorio nuclear se rompe transitoriamente, la Ran GTPasa y las importinas juegan un papel adicional. El complejo Ran GTPasa-importín β ayuda a situar el huso de microtúbulos en el perímetro de la célula para facilitar la segregación de los cromosomas en la división celular y también regula la interacción de los microtúbulos con otras estructuras celulares.

Las bacterias también utilizan secuencias señal para el destino de las proteínas

Las bacterias pueden dirigir proteínas a las membranas internas o externas, al espacio periplasmático entre estas membranas o al medio extracelular. Utilizan secuencias señal en el extremo amino de las proteínas **(Fig. 27-45)**, parecidas a las encontradas en las proteínas eucarióticas destinadas al RE, a las mitocondrias y a los cloroplastos.

La mayor parte de las proteínas exportadas por *E. coli* usan la ruta mostrada en la **Figura 27-46**. Después de la traducción, una proteína destinada a la exportación, puede plegarse sólo lentamente, pues su secuencia amino-terminal impide el plegamiento. La chaperona soluble SecB se une a la secuencia señal de la proteína o a otras características de su estructura parcialmente plegada. La proteína unida se transfiere entonces a SecA, una proteína asociada a la superficie interna de la membrana plasmática. SecA actúa tanto de receptor como de ATPasa de translocación. La proteína, una vez liberada de SecB y unida a SecA, se transfiere a un complejo de translocación en la membrana, formado por SecY, E y G, y se transloca paso a paso al otro lado de la membrana a través del complejo SecYEG en fragmentos de unos 20 residuos aminoácidos. Cada paso es facilitado por la hidrólisis de ATP, catalizada por SecA.

Una proteína exportada es, pues, empujada a través de la membrana por una proteína SecA localizada en la superficie citoplasmática, en lugar de de ser extraída a

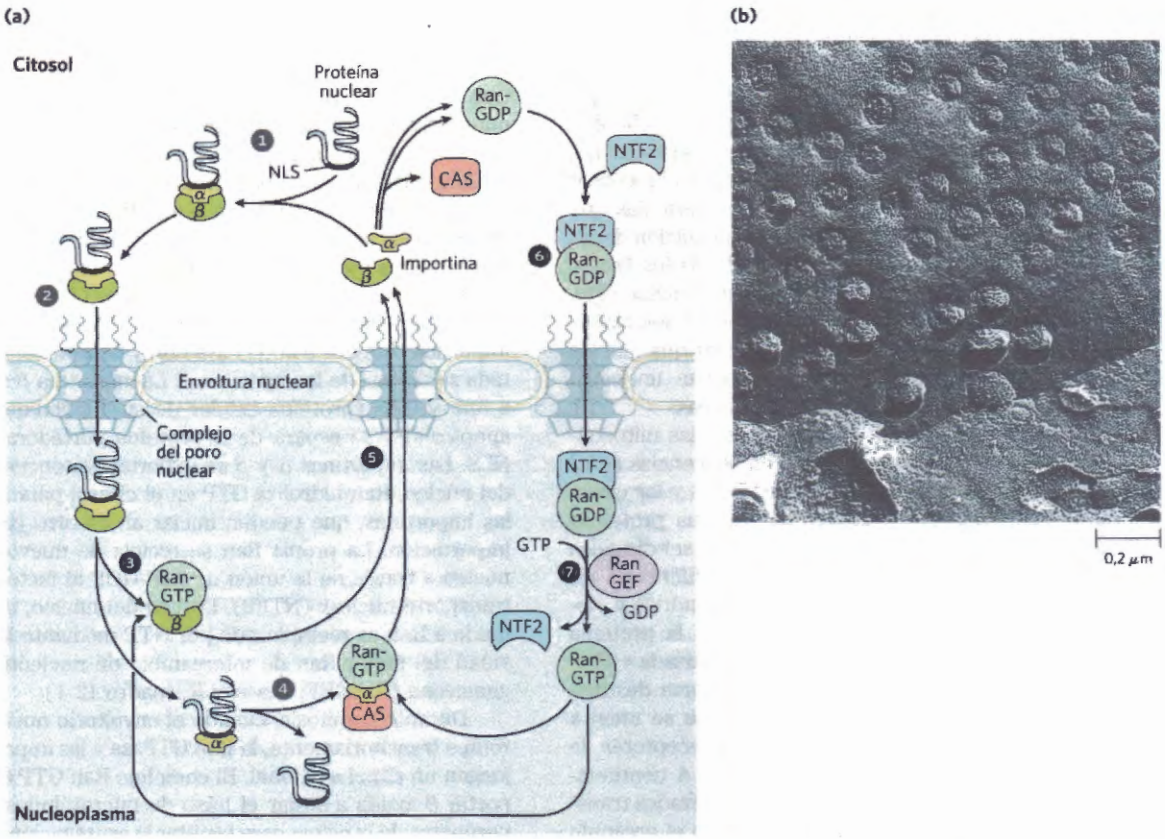


FIGURA 27-44 Direccionamiento de proteínas nucleares. (a) ❶ Una proteína con una señal de localización nuclear adecuada (NLS) se une a un complejo de importina α y β. ❷ El complejo resultante se une a un poro nuclear y se transloca. ❸ Dentro del núcleo la disociación de la importina β es facilitada por la unión de Ran-GTP. ❹ La importina α se une a Ran-GTP y CAS (proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular), liberándose la proteína nuclear. ❺ Las importinas α y β y CAS se transportan fuera del núcleo y se reciclan. ❻ La Ran-GDP se une a NTF2 y se transporta de nuevo al núcleo. ❼ RanGEF promueve el intercambio de GDP por GTP en el núcleo, y la Ran-GTP está dispuesta para procesar otro complejo de importina con una proteína con NLS **(b)** Micrografía electrónica de barrido de la superficie de la envoltura nuclear en la que pueden observarse numerosos poros nucleares. El complejo del poro nuclear es uno de los mayores agregados moleculares de la célula (M_r ~ 5 x 10^7). Está formado por muchas copias de 30 proteínas diferentes.[Fuentes: **(a)** Modificado de C. Strambio-De-Castillia et al., *Nature Rev.Mol.Cell Biol.* 11; 490, 2010, Fig. 1. **(b)** Don W. Fawcett/ Science Source.]

CopyStation

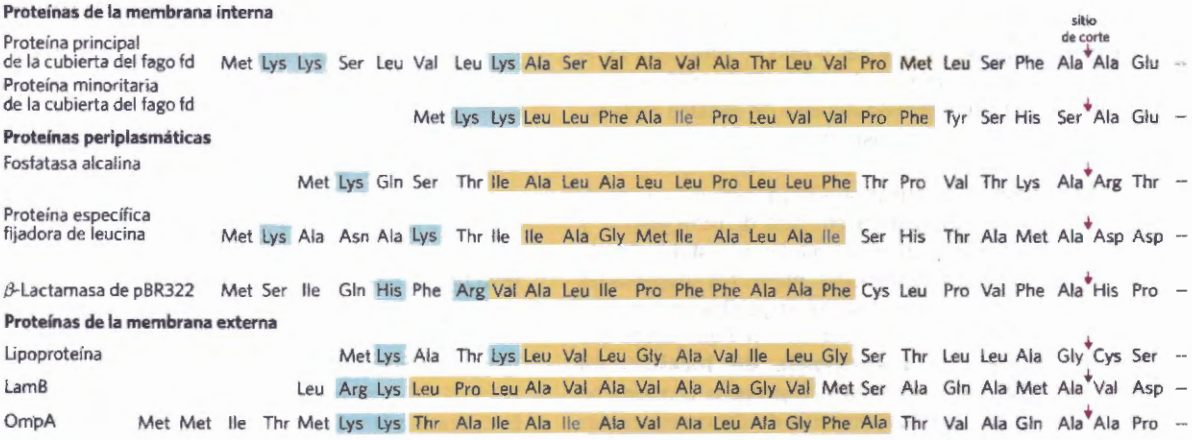


FIGURA 27-45 Secuencias señal utilizadas para el destino a diferentes localizaciones en bacterias. Se resaltan los aminoácidos básicos (azul) cerca del extremo amino-terminal y los aminoácidos del núcleo hidrofóbico (amarillo). Los sitios de corte que marcan los extremos de las secuencias señal se indican con flechas rojas. Obsérvese que la membrana bacteriana interna (véase la Fig. 1-6) es el lugar donde tiene lugar la unión de las proteínas de la cubierta y el DNA que producirá las partículas del fago fd. OmpA es la proteína A de la membrana externa; LamB es una proteína receptora del bacteriófago lambda en la superficie celular.

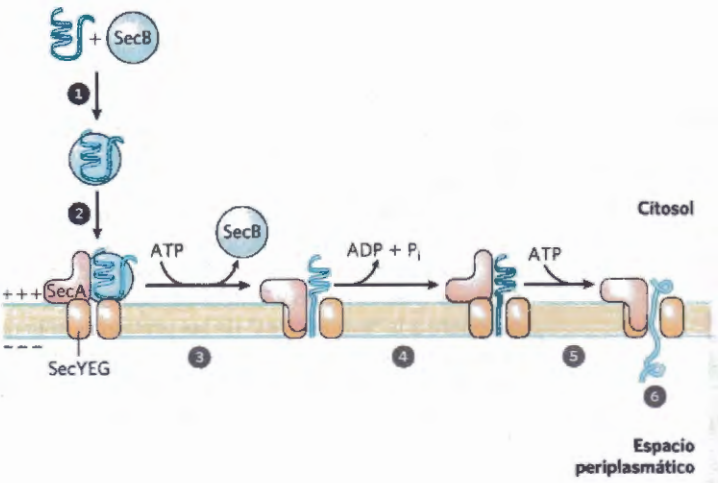


FIGURA 27-46 Modelo de la exportación de proteínas en las bacterias. ❶ Un polipéptido recién sintetizado se une a la chaperona citosólica SecB, que lo transfiere ❷ a SecA, una proteína asociada con el complejo de translocación (SecYEG) en la membrana celular bacteriana. ❸ Se libera SecB y SecA se inserta en la membrana, forzando la exportación de unos 20 residuos aminoácidos de la proteína destinada a la exportación a través del complejo de translocación. ❹ La hidrólisis de un ATP por SecA suministra la energía para un cambio conformacional que provoca que SecA abandone la membrana y libere el polipéptido. ❺ SecA une otra molécula de ATP y el siguiente fragmento de 20 residuos aminoácidos es empujado al otro lado de la membrana a través del complejo de translocación. Los pasos ❹ y ❺ se repiten hasta que la ❻ proteína entera ha pasado al otro lado y se ha liberado en el periplasma. El pontencial electroquímico a través de la membrana (indicado por + y –) también suministra parte de la fuerza motriz necesaria para la translocación de la proteína.

través de la membrana por una proteína localizada en la superficie periplasmática. Esta diferencia puede reflejar simplemente la necesidad de la ATPasa de translocación de encontrarse donde el ATP esté disponible. El potencial electroquímico transmembrana puede también suministrar energía para la translocación de una proteína mediante un mecanismo todavía no aclarado.

Aunque la mayoría de las proteínas bacterianas exportadas usan esta ruta, algunas utilizan una ruta alternativa que depende de señales de reconocimiento y de proteínas receptoras homólogas a los componentes de las SRP y los receptores SRP eucarióticos (Fig. 27-40).

Las células importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptores

Las células eucarióticas importan algunas proteínas del medio circundante, tales como la lipoproteína de baja densidad (LDL), la proteína transportadora de hierro transferrina, hormonas peptídicas y proteínas circulantes destinadas a la degradación. Hay varias rutas de importación **(Fig. 27-47)**. En una de estas rntas, las proteínas se unen a receptores en invaginaciones de la membrana denominadas **cavidades revestidas**, que concentran receptores destinados a la endocitosis, con preferencia a otras proteínas de la superficie celular. Las cavidades están recubiertas en su lado citosólico por una malla de la proteína **clatrina,** que forma estructuras poliédricas cerradas **(Fig. 27-48)**. La malla de clatrina crece a medida que los receptores van siendo ocupados por proteínas diana, hasta que una vesícula endocítica completa unida a la membrana se separa por escisión de la membrana plasmática con ayuda de la gran GTPasa **dinamina**, y pasa al citoplasma. La clatrina se elimina rápidamente por enzimas decapantes y la vesícula se fusiona con un endosoma. La actividad de las ATPasas de las membranas de los endosomas reduce el pH, lo que facilita la disociación de los receptores de sus proteínas diana. En una ruta relacionada, la caveolina provoca la invaginación de zonas de la membrana que contienen balsas lipídicas asociadas a ciertos receptores (véase la Fig. 11-20). A continuación, estas vesículas endocíticas se fusionan con estructuras internas que contienen caveolina, caveosomas, donde las moléculas internalizadas son clasificadas y dirigidas a otras partes de la célula, tras lo cual las caveolinas pueden ser recicladas hacia la superficie de la membrana. También

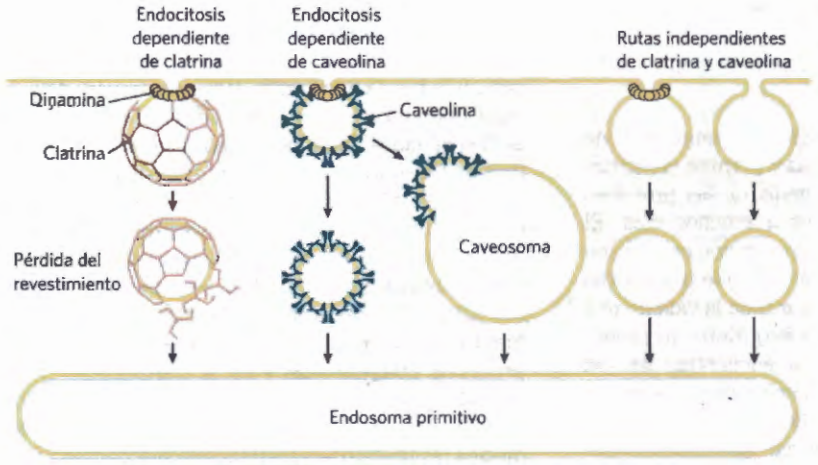


FIGURA 27-47 Resumen de las vías de endocitosis en las células eucarióticas. Las vías dependientes de clatrina o caveolina utilizan la GTPasa dinamina para generar vesículas a partir de la membrana. Algunas vías no usan clatrina o caveolina, algunas usan dinamina y otras no. [Modificado de S. Mayor and R.E. Pagano, *Nature Rev, Mol.Cell Biol.* 8;603, 2007.]

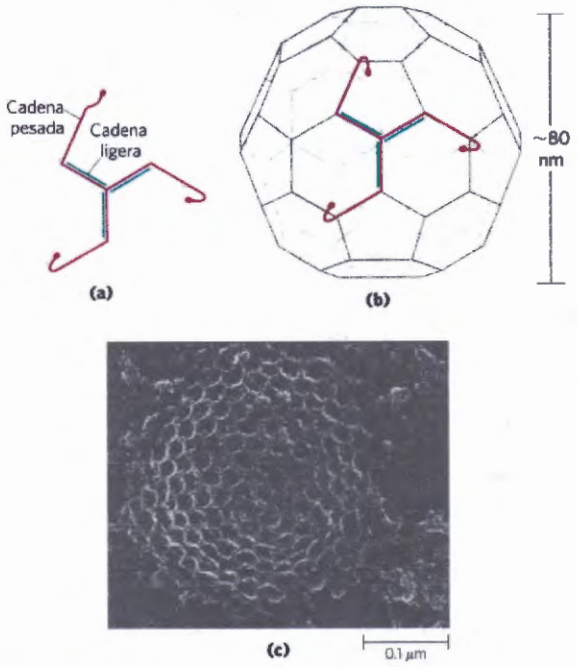


FIGURA 27-48 Clatrina. **(a)** Tres cadenas ligeras **(L)** (M_r 35.000) y tres cadenas pesadas **(H)** (M_r 180.000) forman la unidad de clatrina $(HL)_3$, organizada en una estructura de tres patas denominada triesquelion. **(b)** Los triesqueliones tienen tendencia a formar redes poliédricas. **(c)** Micrografía electrónica de una cavidad revestida en la cara citosólica de la membrana plasmática de un fibroblasto. [Fuente: **(c)** ©1980 Heuser. The Rockefeller University Press. J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560,1980. doi: 10.1083/jcb.84.3.560.]

COPY-STATION

hay rutas independientes de clatrina y caveolina; algunas usan dinamina y otras no.

Las proteínas importadas y los receptores siguen vías distintas y su destino depende del tipo de célula y del tipo de proteína. La transferrina y su receptor finalmente se reciclan. Algunas hormonas, factores de crecimiento y complejos inmunes se degradan junto con sus receptores después de haber producido la respuesta celular apropiada. La LDL se degrada después de que el colesterol que transporta haya llegado a su destino, pero el receptor de la LDL se recicla (véase la Fig. 21-41).

La endocitosis mediada por receptor es aprovechada por algunas toxinas y virus para entrar en las células. La toxina diftérica, la toxina del cólera y el virus de la gripe entran en las células por esta vía.

Todas las células disponen de sistemas de degradación de proteínas especializados

La degradación de proteínas impide la acumulación de proteínas defectuosas o innecesarias y permite el reciclado de los aminoácidos. La vida media de las proteínas eucarióticas varia de 30 segundos a muchos días. El recambio de la mayoría de proteínas es rápido en relación con el tiempo de vida de las células, aunque unas pocas (como la hemoglobina) pueden durar toda la vida de una célula (unos 110 días para un eritrocito). Entre las proteínas que se degradan rápidamente se encuentran las que son defectuosas debido a la introducción de uno o varios aminoácidos incorrectos o a causa del deterioro acumulado durante el funcionamiento normal. Los enzimas que actúan en puntos reguladores clave de las rutas metabólicas a menudo experimentan un recambio rápido.

Las proteínas defectuosas y las que tienen vidas medias cortas generalmente se degradan, tanto en bacterias como en eucariotas, por sistemas citosólicos dependientes de ATP. En los vertebrados, un segundo sistema, que opera en los lisosomas, recicla los aminoácidos de las proteínas de membrana, las proteínas extracelulares y las proteínas de vida media larga.

En *E. coli*, muchas proteínas son degradadas por una proteasa dependiente de ATP que contiene AAA + ATPasas (ver capítulo 25) denominada Lon (el nombre se refiere a la "forma larga" de las proteínas, sólo observada cuando esta proteasa está ausente), ClpXP, ClpAP, ClpCP, ClpYQ y FtsH. Cada sistema tiene como objetivo determinadas proteínas que se diferencian por su estructura o localización subcelular o ambas cosas. Normalmente la hidrólisis del ATP se utiliza para conducir una determinada proteína a través de los poros a la cámara proteolítica, desplegando la proteína durante el proceso. Las proteínas se cortan dentro de la cámara. . Una vez que la proteína ha sido reducida a péptidos pequeños e inactivos, otras proteasas independientes de ATP completan el proceso de degradación.

En las células eucarióticas, la ruta dependiente de ATP es totalmente diferente. Un componente clave del sistema es la proteína **ubiquitina,** que como su nombre indica, está presente en todos los reinos eucarióticos. La ubiquitina (76 residuos aminoácidos), una de las proteínas más conservadas conocidas, es prácticamente idéntica en organismos tan diferentes como las levaduras y el hombre y es la llave de la proteostasis (ver Figs 4-25 y 15-2) y la regulación del ciclo celular. La ubiquitina se une covalentemente a proteínas destinadas a la destrucción a través de una ruta dependiente de ATP en la que intervienen tres enzimas diferentes llamados enzimas activadores E1, enzimas conjugadores E2 y ligasas E3 **(Fig. 27-49)**.

Las proteínas ubiquitinadas son degradadas por un gran complejo (M_r 2,5 x 10^6) denominado **proteasoma 26S (Fig. 27-50)**. El proteasoma eucariótico consiste en dos copias de cada una de al menos 32 subunidades diferentes, la mayor parte de las cuales están muy conservadas desde las levaduras a los humanos. El proteasoma contiene dos tipos principales de subcomplejos, una partícula núcleo en forma de barril y partículas reguladoras en ambos extremos del barril. La partícula núcleo 20S consta de cuatro anillos; los anillos exteriores están formados por siete subunidades α y los anillos interiores por siete subunidades β. Tres de las siete subunidades de cada anillo β tienen actividad proteasa, cada una con su propia especificidad de sustrato. Los anillos apilados de la partícula núcleo forman la estructura en forma de barril, en el interior de la cual se degradan las proteínas. La partícula reguladora 19S en cada extremo de la partícula núcleo contiene 18 subunidades, algunas de las cuales reconocen e interaccionan con proteínas ubiquitinadas. Seis de las subunidades son AAA+ATPasas (véase el Capítulo 25), que probablemente estén implicadas en el desplegamiento de las proteínas ubiquitinadas y en la translocación del polipéptido desplegado al interior de la partícula núcleo para su degradación. La partícula 19S también desubiquitina las proteínas a medida que son degradadas en el

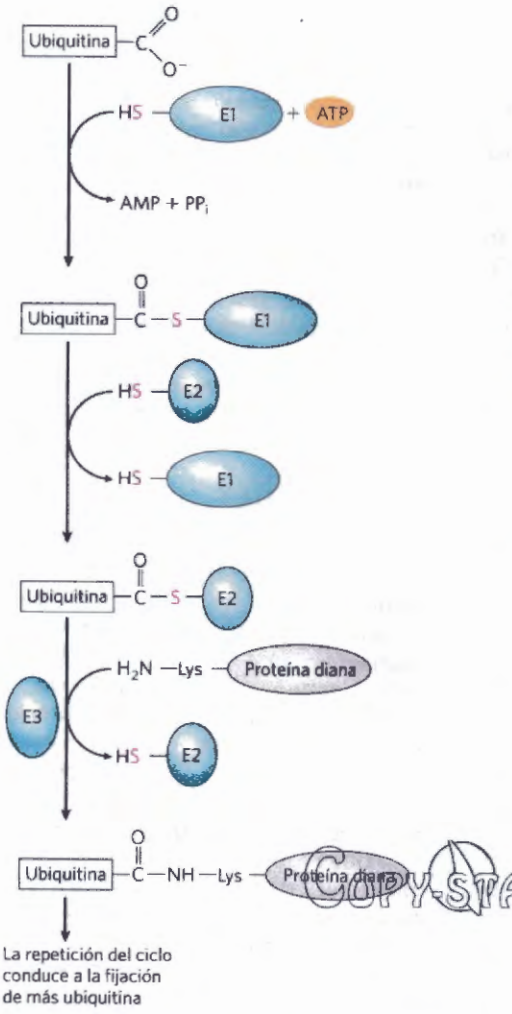


FIGURA 27-49 Proceso en tres pasos por el que la ubiquitina se une a una proteína. Intervienen dos intermedios enzima-ubiquitina diferentes. El grupo carboxilo libre del residuo Gly carboxilo-terminal de la ubiquitina se une primero a un enzima activador de clase E1 a través de un tioéster. A continuación, la ubiquitina se transfiere a un enzima conjugante E2. Finalmente, una ligasa E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina desde E2 a la diana, a la que se une la ubiquitina mediante un enlace amida (isopeptídico) con un grupo ε-amino de un residuo Lys de la proteína diana. Ciclos adicionales producen poliubiquitina, un polímero covalente de subunidades de ubiquitina, que señala a la proteína como destinada a la destrucción en los eucariotas. En la mayoría de células eucarióticas están presentes múltiples rutas de este tipo para diferentes dianas proteicas.

proteasoma. La mayoría de las células tienen complejos reguladores adicionales que pueden reemplazar la partícula 19S. Estos reguladores alternativos no hidrolizan ATP y no se unen a la ubiquitina, pero son importantes en la degradación de determinadas proteínas celulares. El proteasoma 26S puede ser eficazmente complementado con complejos reguladores que cambian con las condiciones celulares.

Aunque no se conocen todavía todas las señales que desencadenan la ubiquitinación, se ha identificado una muy sencilla. El primer residuo aminoácido, que permanece después de eliminar el residuo Met amino-terminal o de cualquier otra modificación proteolítica del extremo amino-terminal, tiene una influencia profunda sobre la vida media de muchas proteínas (Tabla 27-9). Estas señales amino-terminales se han conservado durante miles de millones de años de evolución; las señales son las mismas en los sistemas de degradación de proteínas bacterianos y en la ruta humana de ubiquitinación. Señales más complejas, como la caja de destrucción, discutida en el Capítulo 12 (véase la Fig. 12-35), están siendo estudiadas.

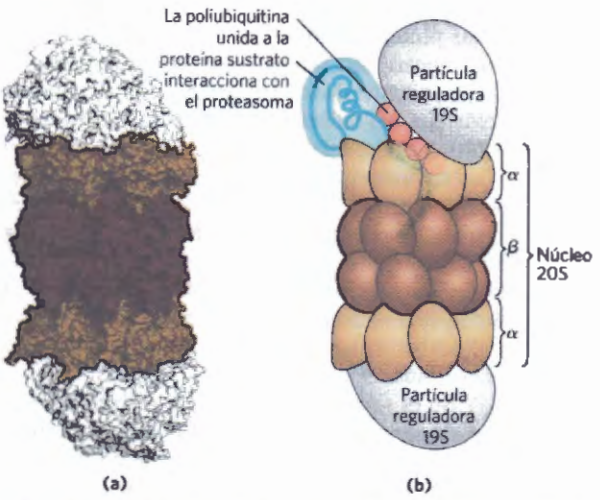


FIGURA 27-50 Estructura tridimensional de un proteasoma eucariótico. El proteasoma 26S está muy conservado en todos los eucariotas. Los dos subcomplejos son la partícula núcleo 20S y la partícula reguladora 19S, también llamada casquete. **(a)** La partícula núcleo consiste en cuatro anillos que forman una estructura en forma de barril. Cada uno de los anillos interiores tiene siete subunidades β diferentes (marrón oscuro), tres de las cuales con actividad proteasa (marrón claro). Los anillos exteriores constan de siete subunidades (gris). Una partícula reguladora forma un casquete en cada extremo de la partícula núcleo. **(b)** La partícula reguladora une las proteínas ubiquitinadas, las despliega y las transloca al interior de la partícula núcleo, donde son degradadas hasta péptidos de 3 a 25 residuos aminoácidos. [Fuente: **(a)** PDB ID 3L5Q, K.Sadre-Bazzaz et al., *Mol.Cell* 37:728, 2010.]

La proteólisis dependiente de ubiquitina es tan importante para la regulación de procesos celulares

TABLA 27-9 Relación entre la vida media de una proteína y su residuo aminoácido amino-terminal

Residuo amino-terminal	Vida media*
Estabilizantes	
Ala, Gly, Met, Ser, Thr, Val	>20 h
Desestabilizantes	
Gln, Ile	~30 min
Glu, Tyr	~10 min
Pro	~7 min
Asp, Leu, Lys, Phe	~3 min
Arg	~2 min

Fuente: Information from A. Bachmair et al., *Science* 234:179, 1986.

*Las vidas medias se midieron en levadura con β-galactosidasa, que se modificó de modo que en cada experimento tuviese un residuo amino-terminal diferente. Las vidas medias pueden variar para proteínas diferentes y en organismos diferentes, pero parece que este patrón general sirve para todos los organismos.

COPY-STATION

como para la eliminación de las proteínas defectuosas. Muchas proteínas requeridas en una sola fase del ciclo celular eucariótico son rápidamente degradadas por la ruta dependiente de ubiquitina una vez han cumplido su función. La degradación de la ciclina dependiente de ubiquitina es esencial en la regulación del ciclo celular (). Los componentes E1, E2 y E3 de la cascada de ubiquitinación (Fig. 27-49) son, de hecho, grandes familias de proteínas. Enzimas E1, E2 y E3 diferentes muestran diferentes especificidades por sus proteínas diana y de esta forma regulan diferentes procesos celulares. Algunos de estos enzimas están restringidos a ciertos compartimientos celulares, como reflejo de su función especializada.



No es sorprendente que los defectos en las rutas de ubiquitinización estén detrás de numerosos estados patológicos. La incapacidad de degradar ciertas proteínas que activan la división celular (los productos de los oncogenes) puede provocar la formación de tumores, mientras que una degradación demasiado rápida de proteínas supresoras de tumores puede tener el mismo efecto. La degradación ineficiente o demasiado rápida de las proteínas celulares también parece jugar un papel en otras situaciones: enfermedades renales, asma, enfermedades neurodegenerativas, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (asociadas con la formación de estructuras proteináceas, características en las neuronas), fibrosis quística (debida en algunos casos a una degradación demasiado rápida de un canal iónico de cloruro con la consiguiente pérdida de función; véase el Recuadro 11-2), el síndrome de Liddle (en el que no se degrada un canal de sodio, lo que tiene como consecuencia la absorción excesiva de Na^+ y la aparición temprana de hipertensión) y muchas otras enfermedades. Se están diseñando medicamentos destinados a inhibir la función del proteasoma como tratamiento potencial para algunas de estas enfermedades. En un entorno metabólico cambiante, la degradación de proteínas es tan importante para la supervivencia celular como la síntesis de proteínas, quedando mucho por aprender acerca de estas interesantes rutas. ■

RESUMEN 27.3 Destino y degradación de las proteínas

■ Después de la síntesis, muchas proteínas son dirigidas a localizaciones particulares en la célula. Un mecanismo de destino está basado en una secuencia péptido señal, generalmente localizada en el extremo amino-terminal de la proteína recién sintetizada.

■ En las células eucarióticas, una clase de secuencia señal es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal (SRP), que se une a la secuencia señal tan pronto como ésta aparece en el ribosoma, y transfiere el ribosoma entero y el polipéptido incompleto al RE. Los polipéptidos con estas secuencias señal son transferidos a la luz del RE a medida que se sintetizan, donde pueden ser modificados o transferidos al complejo de Golgi, para ser clasificados y enviados a los lisosomas, a la membrana plasmática o a vesículas de transporte.

■ Las proteínas destinadas a las mitiocondrias y a los cloroplastos en las células eucarióticas y las destinadas a la exportación en las bacterias también utilizan una secuencia señal amino-terminal.

■ Las proteínas destinadas al núcleo tienen una secuencia señal interna que, a diferencia de otras secuencias señal, no es cortada una vez la proteína ha alcanzado su destino.

■ Algunas células eucarióticas importan proteínas mediante endocitosis facilitada por receptor.

■ Todas las células acaban degradando sus proteínas mediante sistemas proteolíticos especializados. Las proteínas defectuosas y las que están sometidas a recambio rápido se degradan por un sistema dependiente de ATP. En las células eucarióticas, las proteínas se marcan primero por unión a ubiquitina, una proteína muy conservada. La proteolisis dependiente de ubiquitina tiene lugar en proteasomas, también muy conservados, y es fundamental en la regulación de muchos procesos celulares.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

aminoacil-tRNA 1070
aminoacil-tRNA sintetasas 1070
traducción 1070
codón 1070
marco de lectura 1070
codón de inicio 1073
codones de terminación 1073
marco de lectura abierto (ORF) 1073
anticodón 1076
balanceo 1076
desplazamiento del marco de traducción 1077
edición de RNA 1078
inicio 1080
secuencia Shine-Dalgarno 1089
sitio (A) aminoacilo 1093
sitio (P) peptidilo 1093
sitio (E) de salida 1093
complejo de inicio 1093
factores de elongación 1095
peptidil transferasa 1096
translocación 1096
factores de liberación 1098
supresor sin sentido 1100
polisoma 1100
modificación postraducción 1100
puromicina 11032
tetraciclina 1103
cloranfenicol 1103
cicloheximida 1104
estreptomicina 1104
toxina diftérica 1104
ricina 1104
secuencia señal 1105
partícula de reconocimiento de señal (SRP) 1106
complejo de translocación del péptido 1106
tunicamicina 1106
secuencia de localización nuclear (NLS) 1109
cavidades revestidas 1111
clatrina 1111
dinamina 1111
ubiquitina 1112
proteasoma 1112

Problemas

1. Traducción del RNA mensajero Proponga las secuencias de aminoácidos de los péptidos formados por los ribosomas en respuesta a las siguientes secuencias de mRNA, suponiendo que el marco de lectura empieza con las tres primeras bases de cada secuencia.

(a) GGUCAGUCGCUCCUGAUU
(b) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU
(c) CAUGAUGCCUGUUGCUAC
(d) AUGGACGAA

2. ¿Cuántas secuencias de mRNA diferentes puede especificar una secuencia de aminoácidos? Escriba todas las secuencias posibles de mRNA que pueden codificar el tri-

péptido sencillo Leu-Met-Tyr. Su respuesta le dará una idea del número de posibles mRNA que pueden codificar un polipéptido.

3. ¿Puede predecirse la secuencia de bases de un mRNA a partir de la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico? Una secuencia de bases dada de un mRNA codifica una secuencia, y sólo una, de aminoácidos de un polipéptido, si se especifica el marco de lectura. A partir de una secuencia dada de residuos aminoácidos de una proteína como el citocromo *c*, ¿podemos predecir la secuencia de bases de un mRNA único que la codifique? Exponga las razones de su respuesta.

4. Codificación de un polipéptido por un DNA dúplex La hebra molde de un segmento de DNA de doble cadena contiene la secuencia

(5')CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG(3')

(a) ¿Cuál es la secuencia de bases del mRNA que puede ser transcrito a partir de esta hebra?

(b) ¿Qué secuencia de aminoácidos podría ser codificada por la secuencia de bases del mRNA de (a) empezando desde el extremo 5'?

(c) Si la hebra complementaria (no molde) de este DNA fuese transcrita y traducida, ¿la secuencia de aminoácidos resultante sería la misma que en (b)? Explique el significado biológico de su respuesta.

5. La metionina tiene un solo codón La metionina es uno de los dos aminoácidos que tiene un solo codón. ¿De qué modo el único codón de la metionina puede especificar tanto el residuo de inicio como los residuos Met interiores en los polipéptidos sintetizados por *E. coli*?

6. El código genético en acción Traduzca el siguiente mRNA , empezando por el primer nucleótido 5', asumiendo que la traducción se realiza en una célula de *E. coli*. Si todo el tRNA hace el máximo uso de las normas de balanceo pero no contiene Iosina ¿ Cuantos tRNAs distintos se necesitan para traducir este RNA?

(5')AUGGGUCGUGAGUCAUCGUUAAUUG
UAGCUGGAGGGGAGGAAUGA(3')

7. mRNA sintéticos El código genético fue descifrado con polirribonucleótidos sintetizados tanto enzimática como químicamente en el laboratorio. A partir de lo que ahora sabemos del código genético, ¿cómo diseñaría un poliribonucleótido que pudiera servir de mRNA que codificara predominantemente residuos de Phe y un pequeño número de residuos Leu y Ser? ¿Qué otro u otros aminoácidos serían codificados por este poliribonucleótido, aunque en menor proporción?

8. Coste energético de la biosíntesis de proteínas Determine el coste energético mínimo, en términos de equivalentes de ATP consumidos, que se requieren para la biosíntesis de la cadena de β-globina de la hemoglobina (146 residuos), partiendo de una mezcla que *contenga todos los* aminoácidos necesarios, ATP y GTP. Compare su respuesta con el coste energético directo de la biosíntesis de una cadena lineal de glucógeno de 146 residuos de glucosa unidos por enlaces (α1→4), partiendo de una mezcla que incluya glucosa, UTP y ATP (Capítulo 15). A partir de sus datos, ¿cuál es el coste energético *extra* de sintetizar una proteína, en la que todos los residuos estén ordenados en una secuencia específica, comparado con el coste de sintetizar un polisácárido que contenga el mismo número de residuos, pero que carezca de la información contenida en la proteína?

Además del coste energético directo de la síntesis de una proteína, hay costes indirectos: los requeridos para que la célula fabrique los enzimas necesarios para la síntesis proteica. Compare la magnitud de los costes indirectos para una célula eucariótica de la biosíntesis de cadenas lineales (α1→4) de glucógeno y de la biosíntesis de polipéptidos, en función de la maquinaria enzimática implicada.

9. Predicción de anticodones a partir de codones La mayoría de aminoácidos tienen más de un codón y se unen a más de un tRNA, cada uno con un anticodón diferente. Escriba todos los anticodones posibles para los cuatro codones de la glicina: (5')GGU, GGC, GGA y GGG.

(a) De su respuesta ¿qué posiciones en los anticodones son determinantes primarios de su especificidad de codón en el caso de la glicina?

(b) De estos apareamientos anticodón-codón, ¿cuáles tienen un par de bases con balanceo?

(c) ¿Qué apareamientos anticodón-codón tienen en las tres posiciones puentes de hidrógeno fuertes tipo Watson-Crick?

10. Efecto del cambio de una sola base sobre la secuencia de aminoácidos Muchas pruebas confirmatorias importantes sobre el código genético provienen de la naturaleza de los cambios en la secuencia de aminoácidos en proteínas mutantes después del cambio de una sola base en el gen que codifica la proteína. ¿Cuáles de los siguientes reemplazamientos de aminoácidos serían consistentes con el código genético si los reemplazamientos fueran debidos al cambio de una sola base? ¿Cuáles no pueden ser el resultado de mutaciones en una sola base? ¿Por qué?

(a) Phe ⟶ Leu
(b) Lys ⟶ Ala
(c) Ala ⟶ Thr
(d) Phe ⟶ Lys
(e) Ile ⟶ Leu
(f) His ⟶ Glu
(g) Pro ⟶ Ser

11. Resistencia del código genético frente a las mutaciones La siguiente secuencia de RNA representa el principio de una pauta de lectura abierta. ¿Qué cambios (si los hay) pueden producirse en cada posición sin generar un cambio en los aminoácidos codificados?

(5')AUGAUAUUGCUAUCUUGGACU

12. Base de la mutación de la célula falciforme En la hemoglobina de la célula falciforme hay un residuo Val en la posición 6 de la cadena de la β-globina en lugar del residuo Glu encontrado en esta posición en la hemoglobina A normal. ¿Puede predecir qué cambio tuvo lugar en el codón del glutamato en el DNA que justifique la sustitución de Glu por Val?

13. Corrección de pruebas por las aminoacil-tRNA sintetasas La isoleucil-tRNA sintetasa posee una función de corrección de pruebas que asegura la fidelidad de la reacción de aminoacilación, pero la histidil-tRNA sintetasa carece de esta función de corrección de pruebas. Explíquelo.

14. Importancia del "segundo código genético" Algunas aminoacil-tRNA sintetasas no reconocen ni unen el anticodón de sus tRNA, sino que utilizan otros rasgos estructurales de los tRNA para lograr la especificidad de fijación. Los tRNA de la alanina pertenecen aparentemente a esta categoría.

(a)¿Qué características del $tRNA^{Ala}$ son reconocidas por la Ala-tRNA sintetasa?

(b)Describa las consecuencias de una mutación C→G en la tercera posición del anticodón del $tRNA^{Ala}$.

COPY STATION

(c)¿Qué otros tipos de mutaciones pueden tener efectos similares?

(d) Mutaciones de estos tipos no se encuentran nunca en pohlaciones naturales de organismos. ¿Por qué? (Sugerencia: Considere lo que podría suceder tanto a las proteínas individuales como al organismo en su conjunto).

15. Ritmo de la síntesis de proteínas Un ribosoma bacteriano puede sintetizar unos 20 péptidos por minuto. Si el promedio de longitud de las proteínas bacterianas es aproximadamente de 260 aminoácidos, ¿Cuantas proteínas pueden los ribosomas de una célula de E.coli sintetizar en 20 minutos si todos los ribosomas están funcionando al máximo?

16. El papel de los factores de traducción Un investigador aisla variantes mutantes de factores de traducción bacteriana IF2, EF-Tu y EF-G. En cada caso la mutación permite el doblamiento apropiado de las proteínas y la unión a GTP pero no permite la hidrólisis del GTP. ¿En qué estadio la traducción será bloqueada por cada proteína mutante?

17. Mantenimiento de la fidelidad de la síntesis de proteínas Los mecanismos químicos utilizados para evitar errores en la síntesis de proteínas son diferentes de los utilizados durante la replicación del DNA. Las DNA polimerasas utilizan una actividad exonucleasa 3'—5' correctora de pruebas para eliminar nucleótidos mal apareados, incorrectamente incorporados en una cadena de DNA en crecimiento. No existe una función correctora de pruebas equivalente en los ribosomas y, de hecho, nunca se comprueban las identidades de los aminoácidos unidos al tRNA entrante que son añadidos al polipéptido en crecimiento. Un paso de corrección de pruebas que hidrolizase el último enlace peptídico formado cuando se hubiese incorporado un aminoácido incorrecto en un polipéptido en crecimiento (análogo al paso de corrección de pruebas de las DNA polimerasas) sería poco práctico. ¿Por qué? (Sugerencia: Considere cómo se mantiene la unión entre el polipéptido en crecimiento y el mRNA durante la elongación; véanse las Figs. 27-29 y 27-30).

18 Perfil ribosomal En el método de perfil ribosomal (Fig 27-37), los segmentos de mRNA que están unidos y protegidos por ribosomas son aislados y convertidos a DNA para ser secuenciados. Aunque los segmentos de mRNA son normalmente sólo parte de todo el RNA protegido por los ribosomas y aislados después de ser tratados con ribonucleasa. ¿Qué otros tipos de RNA serán aislados en este protocolo?

19. Predicción de la localización celular de una proteína El gen de un polipéptido eucariótico de 300 aminoácidos se altera para que una secuencia reconocida por la SRP se encuentre en el extremo amino del polipéptido y una señal de reconocimiento nuclear (NLS) se encuentre en el interior, con inicio en el residuo 150. ¿Dónde es probable que se encuentre la proteína en la célula?

20. Requerimientos para la translocación de proteínas a través de una membrana La proteína de secreción bacteriana OmpA tiene un precursor, ProOmpA, que posee la secuencia señal amino-terminal necesaria para la secreción. Si ProOmpA purificada se desnaturaliza con urea 8 M y a continuación se elimina rápidamente la urea (p.ej. pasando la disolución de proteína rápidamente a través de una columna de filtración en gel), la proteína puede ser translocada in vitro a través de membranas internas bacterianas aisladas. Sin embargo, la translocación no sucede si ProOmpA se incuba primero durante varias horas en ausencia de urea. Además, la capacidad de translocación se mantiene durante largo tiempo si se incuba ProOmpA en presencia de otra proteína bacteriana denominada factor desencadenante. Describa la función probable de este factor.

21. Capacidad de codificación de proteínas de un DNA vírico El genoma de 5.386 pares de bases del bacteriófago ϕX174 contiene genes para 10 proteínas, designadas de A a K, cuyos tamaños están indicados en la tabla. ¿Cuánto DNA sería necesario para codificar estas 10 proteínas? ¿Cómo puede reconciliar el tamaño del genoma de ϕX179 con su capacidad de codificación?

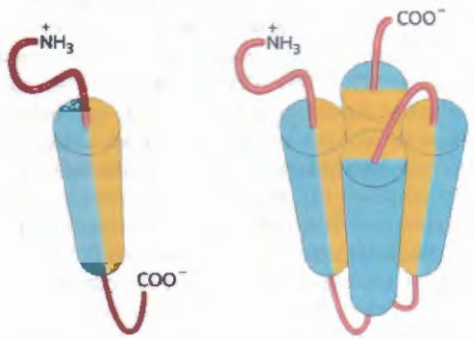
Proteína	Número de residuos aminoácidos	Proteína	Número de residuos aminoácidos
A	455	F	427
B	120	G	175
C	86	H	328
D	152	J	38
E	91	K	56

Problema de análisis de datos

22. Diseño de proteínas mediante genes formados al azar Los estudios acerca de la secuencia de aminoácidos y de las correspondientes estructuras tridimensionales de proteínas de tipo salvaje o mutantes han generado importantes conocimientos sobre los principios que gobiernan el plegamiento de las proteínas. Una manera de comprobar la validez de estos conocimientos consistiría en *diseñar* una proteína de acuerdo con estos principios y ver si ésta se pliega como sería de esperar.

Kamtekar y colaboradores (1993) aprovecharon determinadas propiedades del código genético para generar al azar secuencias proteicas con patrones definidos de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos. Su diseño combinaba conocimientos sobre la estructura de proteínas y las propiedades de los aminoácidos y del código genético para explorar los factores que influyen en la estructura de las proteínas.

Se propusieron generar un conjunto de proteínas con la simple estructura de haz de cuatro hélices mostrada al final del párrafo, con las hélices α (representadas por cilindros) conectados por segmentos en ovillo estadístico (rosa). Todas las hélices α son anfipáticas, los grupos R de un lado de la hélice son exclusivamente hidrofóhicos (amarillo) y los del otro lado son exclusivamente hidrofílicos (azul). Una proteína formada por cuatro de este tipo de hélices separadas por cortos segmentos de ovillo estadístico se esperaría que se plegara de forma que las caras hidrofílicas de las hélices se orientaran hacia el disolvente.



Una hélice α anfipática — Haz de cuatro hélices

(a)¿Qué fuerzas o interacciones mantienen unidas las cuatro hélices α en el haz?

La Figura 4-4a muestra un segmento de hélice α de diez residuos aminoácidos. Con el cilindro gris central como divisor, cuatro de los grupos R (esferas púrpura) se extienden desde el lado izquierdo de la hélice y seis desde el lado derecho.

(b) Numere los grupos R de la Figura 4-4a desde arriba (amino-terminal; 1) abajo (carboxilo-terminal; 10). ¿Qué grupos R se extienden desde el lado izquierdo y cuáles del derecho?

(c) Suponga que quisiera diseñar este segmento de 10 aminoácidos en forma de hélice antipática, con el lado izquierdo hidrofílico y el lado derecho hidrofóbico. Sugiera una secuencia de 10 aminoácidos que potencialmente pudiera plegarse de este modo. Hay muchas respuestas correctas posibles.

(d) Proponga una posible secuencia de DNA de doble cadena que pudiera codificar la secuencia de aminoácidos elegida en (c). (Se trata de una región interna de una proteína, por lo que no es necesario incluir codones de inicio y de paro).

En lugar de diseñar proteínas de secuencia específica, Kamtekar y colaboradores diseñaron proteínas de secuencia parcialmente al azar, con residuos aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos dispuestos en un patrón controlado. Para ello aprovecharon algunas interesantes propiedades del código genético para construir una genoteca de moléculas de DNA sintéticas de secuencia parcialmente al azar y un determinado patrón.

Para diseñar una secuencia de DNA que codificara secuencias de aminoácidos hidrofóbicos al azar comenzaron con el codón degenerado NTN, donde N puede ser A, G, C o T. Rellenaron cada posición N con una mezcla equimolecular de A, G, C y T en la reacción de síntesis de DNA para generar una mezcla de moléculas de DNA con diferentes nucleótidos en esta posición (véase la Fig. 8-35). Del mismo modo, para codificar secuencias de aminoácidos polares al azar, utilizaron el codón degenerado NAN con una mezcla equimolar de A, G y C (pero en este caso sin T) para rellenar las posiciones N.

(e) ¿Qué aminoácidos pueden ser codificados por el triplete NTN? ¿Son hidrofóbicos todos los aminoácidos de este grupo? ¿Incluye este grupo *todos* los aminoácidos hidrofóbicos?

(f) ¿Qué aminoácidos pueden ser codificados por el triplete NAN? ¿Son todos polares? ¿Incluye este grupo *todos* los aminoácidos polares?

(g) En la síntesis de los codones NAN ¿por qué fue necesario omitir la T de la mezcla de reacción?

Kamtekar y colaboradores clonaron esta genoteca de secuencias de DNA al azar en plásmidos, seleccionaron 48 que produjeron el patrón correcto de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos y los expresaron en *E. coli*. El siguiente paso consistió en determinar si las proteínas se plegaban en la forma prevista. Hubiese sido muy laborioso expresar cada una de las proteínas, cristalizarla y determinar su estructura tridimensional completa. En su lugar, se utilizó la maquinaria de modificación de proteínas de *E. coli* para descartar las secuencias que daban lugar a proteínas muy defectuosas. En este escrutinio inicial, conservaron solamente los clones que daban una banda de proteína de la masa molecular esperada en geles de poliacrilamida con SDS (véase la Fig. 3-18).

(h) ¿Por qué una proteína muy mal plegada no producía una banda de la masa molecular esperada en la electroforesis?

Varias proteínas superaron este ensayo inicial, y el examen posterior mostró que poseían la estructura de cuatro hélices esperada.

(i) ¿Por qué no todas las proteínas con secuencia al azar que pasaron el escrutinio inicial contenían la estructura de cuatro hélices?

COPYSTATION

Referencias

Kamtekar, S., J.M. Schiffer, H. Xiong, J.M. Babik, and M.H. Hecht. 1993. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* 262:1680–1685.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

CAPÍTULO 28

Regulación de la expresión génica

Hay herramientas, disponibles on-line, para el auto-estudio que le ayudarán a practicar lo que han aprendido y que reforzarán los conceptos del capítulo. Vaya a www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

28.1 Principios de regulación génica 1120

28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias 1130

28.3 Regulación de la expresión génica en eucariotas 1139

De los aproximadamente 4.000 genes presentes en un genoma bacteriano típico o de los quizás 20.000 genes del genoma humano, solamente se expresa una parte en una célula determinada y en un momento dado. Algunos productos génicos están presentes en cantidades muy grandes: los factores de elongación requeridos para la síntesis proteica, por ejemplo, se encuentran entre las proteínas más abundantes de las bacterias, y la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco) de las plantas y bacterias fotosintéticas es uno de los enzimas conocidos más abundante en la biosfera. Otros productos génicos se encuentran en cantidades mucho menores; por ejemplo, una célula puede contener solamente unas pocas moléculas de los enzimas que reparan lesiones del DNA poco frecuentes. Las necesidades de algunos productos génicos cambian a lo largo del tiempo. Los requerimientos de enzimas en ciertas vías metabólicas pueden aumentar o disminuir en función de los cambios en la disponibilidad de nutrientes. Durante el desarrollo de un organismo multicelular, algunas proteínas que influyen en la diferenciación celular están presentes solamente un breve lapso de tiempo y en unas pocas células. La especialización de la función celular puede influir profundamente en las necesidades de varios productos génicos; un ejemplo es la elevada concentración de hemoglobina en los eritrocitos, que carece de parangón. Dado el elevado coste de la síntesis proteica, la regulación de la expresión génica es esencial para conseguir una utilización óptima de la energía disponible.

La concentración celular de una proteína viene determinada por un delicado equilibrio entre siete procesos por lo menos, de los que cada uno tiene varios puntos potenciales de regulación:

1. Síntesis del transcrito primario de RNA (transcripción)
2. Modificación postranscripcional del mRNA
3. Degradación del RNA mensajero
4. Síntesis proteica (traducción)
5. Modificaciones postraducción de las proteínas
6. Destino y transporte de las proteínas
7. Degradación de las proteínas

Estos procesos se resumen en la **Figura 28-1**. Hemos examinado varios de estos mecanismos en capítulos anteriores. La modificación postranscripcional del mRNA mediante procesos tales como el corte y empalme alternativo (véase la Fig. 26-19b) o la edición del RNA (véanse las Figs. 27-10, 27-12) pueden determinar qué proteínas se producen a partir de los transcritos de mRNA y en qué cantidades. Diversas secuencias de nucleótidos en un mRNA pueden determinar la velocidad de su degradación. Muchos factores influyen en la velocidad de traducción de un mRNA a proteína, así como en la modificación postraducción de la proteína, su destino, y finalmente su degradación (Capítulo 27).

De los procesos de regulación ilustrados en la Figura 28-1, los que operan a nivel del inicio de la transcripción son los que están mejor documentados y son el objeto principal de este capítulo; aunque también se consideran otros mecanismos. Como se ha visto en capítulos anteriores, la complejidad de un organismo no viene determinada por el número de genes que codifican proteínas. En su lugar, a medida que la complejidad aumenta desde las bacterias a los mamíferos, los mecanismos de regulación se vuelven más elaborados, y la regulación postranscripcional y traduccional juega un mayor papel. Para muchos genes, los procesos de regu-

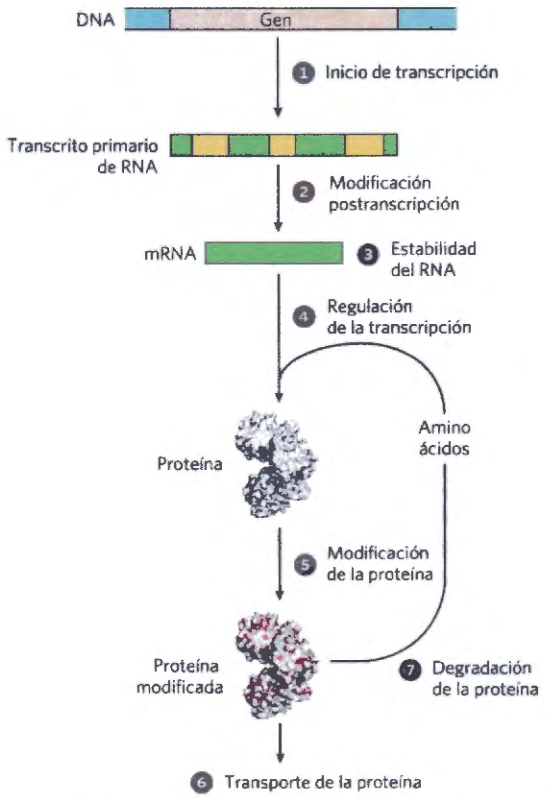


FIGURA 28-1 Siete procesos que influyen sobre la concentración en estado estacionario estacionario de una proteína. Cada proceso tiene diversos puntos de regulación potenciales.

COPY-STATION

lación requieren una considerable inversión de energía química.

El control del inicio de la transcripción permite la regulación sincronizada de múltiples genes que codifican productos con actividades interdependientes. Por ejemplo, cuando su DNA está gravemente dañado, las células bacterianas requieren un incremento coordinado de los niveles de muchos enzimas que intervienen en la reparación del DNA. Tal vez la forma más sofisticada de coordinación se dé en los complejos circuitos de regulación que gobiernan el desarrollo de los eucariotas multicelulares, en los que pueden intervenir muchos tipos de mecanismos reguladores.

Empezaremos examinando las interacciones entre proteínas y DNA que son la clave de la regulación de la transcripción. Después examinaremos las proteínas específicas que influyen en la expresión de genes específicos, primero en las células bacterianas y posteriormente en las eucariotas. En la discusión, se proporciona información sobre la regulación postranscripcional y de la traducción, cuando es necesaria para una mejor comprensión de la amplia diversidad de mecanismos reguladores.

28.1 Principios de regulación génica

Los genes de los productos que se requieren en todo momento, tales como los de los enzimas de las rutas metabólicas centrales, se expresan en un nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de una especie u organismo. Tales genes a menudo se designan como **genes constitutivos**. La expresión constante de un gen se denomina **expresión génica constitutiva**.

Los niveles celulares de otros productos génicos aumentan y disminuyen en respuesta a señales moleculares; esa es la **expresión génica regulada**. Los productos génicos que aumentan de concentración bajo circunstancias moleculares particulares se designan como **inducibles**; el proceso de aumento de su expresión se denomina **inducción**. La expresión de muchos genes que codifican enzimas de reparación del DNA, por ejemplo, es inducida por un sistema de proteínas reguladoras que responden a altos niveles de lesiones en el DNA. Por el contrario, los productos génicos que disminuyen su concentración en respuesta a una señal molecular se designan como **reprimibles** y el proceso se denomina **represión**. Por ejemplo, en las bacterias, la abundancia de triptófano provoca la represión de los genes de los enzimas que catalizan la biosíntesis de triptófano.

La transcripción está facilitada y regulada por interacciones proteína-DNA, especialmente en las que intervienen los componentes proteicos de la RNA polimerasa (Capítulo 26). Primero consideraremos cómo se regula la actividad de la RNA polimerasa y continuaremos con una descripción general de las proteínas que intervienen en este proceso. Después examinaremos la base molecular del reconocimiento de secuencias específicas de DNA por proteínas de unión al DNA.

La RNA polimerasa se une al DNA en los promotores

Las RNA polimerasas se unen al DNA e inician la transcripción en los promotores (véase la Fig. 26-5), sitios generalmente cercanos a los puntos donde empieza la síntesis de RNA en el molde de DNA. La regulación del inicio de la transcripción a menudo comporta cambios en el modo como la RNA polimerasa interacciona con un promotor.

Las secuencias de nucleótidos de los promotores varían considerablemente, lo cual influye en la afinidad de la unión de las RNA polimerasas y, por tanto, en la frecuencia del inicio de la transcripción. Algunos genes de *Escherichia coli* se transcriben una vez por segundo, otros menos de una vez por generación celular. Esta variación se debe en buena parte a diferencias en la secuencia del promotor. En ausencia de proteínas reguladoras, las diferencias en las secuencias del promotor



FIGURA 28-2 Secuencia consenso de muchos promotores de *E. coli*. La mayoría de las sustituciones de bases en las regiones −10 y −35 tienen un efecto negativo sobre la función del promotor. Algunos promotores también incluyen el elemento UP (promotor corriente arriba) (véase la Fig. 26-5)

pueden afectar la frecuencia del inicio de la transcripción en un factor de 1000, o más. La mayoría de los promotores de *E. coli* tienen una secuencia muy parecida a la secuencia consenso **(Fig. 28-2)**. Las mutaciones que los alejan de la secuencia consenso normalmente disminuyen la función de los promotores; contrariamente, las mutaciones que los acercan al consenso normalmente la potencian.

›› Convención Clave: La secuencia de la hebra no molde se muestra, por convención, con el extremo 5' a la izquierda. Los nucleótidos están numerados desde el sitio de inicio de la transcripción, con números positivos hacia la derecha (en la dirección de la transcripción) y negativos hacia la izquierda. N indica un nucleótido cualquiera. ‹‹

Las concentraciones celulares de las proteínas codificadas por los genes constitutivos, aunque se expresen de manera continuada, varían ampliamente. Para estos genes, la interacción RNA polimerasa-promotor tiene una gran influencia en la tasa de inicio de la transcripción; diferencias en la secuencia del promotor permiten a la célula sintetizar el nivel apropiado de cada producto génico constitutivo.

La tasa basal de inicio de la transcripción en los promotores de genes no constitutivos también está determinada por la secuencia del promotor, pero, además, la expresión de estos genes está modulada por proteínas reguladoras. Muchas de estas proteínas actúan a menudo potenciando o interfiriendo con la interacción entre la RNA polimerasa y el promotor.

Las secuencias de los promotores eucarióticos son mucho más variables que las de sus equivalentes procarióticos. Las tres RNA polimerasas eucarióticas requieren normalmente una serie de factores de transcripción generales para unirse a un promotor, y estas pueden influenciar la tasa basal de transcripción. Sin embargo, al igual que en la expresión génica bacteriana, el nivel basal de transcripción está determinado en parte por el efecto de las secuencias del promotor en la función de la RNA polimerasa y sus factores de transcripción asociados.

El inicio de la transcripción se regula mediante proteínas que se unen a los promotores o cerca de ellos

Al menos tres tipos de proteínas regulan el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa: los **factores de especificidad,** que modifican la especificidad de la RNA polimerasa hacia un promotor determinado o un conjunto de promotores; los **represores,** que impiden el acceso de la RNA polimerasa al promotor y los **activadores,** que potencian la interacción RNA polimerasa-promotor.

A medida que va madurando nuestro conocimiento sobre los roles de los reguladores proteicos, muchos nuevos roles para la regulación génica por parte de RNAs también están empezando a surgir. Entre ellos están los **RNAs largos, no codificantes (lncRNAs)**, generalmente definidos como RNAs de más de 200 nucleótidos sin un marco abierto de lectura que codifique para una proteína - distinguiéndose así de los pequeños RNAs funcionales (miRNA, snoRNA, snRNA, etc.) descritos en el Capítulo 26. Los lncRNAs se encuentran en todo tipo de organismos, con cientos de miles expresados en células de mamíferos. Funciones conocidas de los lncRNAs incluyen la regulación del posicionamiento del nucleosoma y de la estructura de la cromatina, el control de la metilación del DNA y las modificaciones postranscripcionales de las histonas, el silenciamiento transcripcional de genes, múltiples roles en la activación y represión transcripcional, y muchos más.

Se estudiaron los factores proteicos de especificidad bacterianos en el Capítulo 26 (véase la Fig. 26-5), aunque no se mencionaron con ese nombre. La subunidad σ del holoenzima de la RNA polimerasa de *E. coli* es un factor de especificidad que interviene en el reconocimiento y la unión al promotor. Una única subunidad σ (M_r 70.000), denominada σ^{70} reconoce la mayoría de los promotores de *E. coli*. En ciertas condiciones, algunas de las subunidades σ^{70} son reemplazadas por uno de otros seis factores de especificidad. Es destacable la sustitución de σ^{70} por σ^{32} (M_r 32.000) cuando las bacterias están sometidas a estrés por calor. Cuando está unida a σ^{32}, la RNA polimerasa se dirige hacia una serie de promotores especializados con una secuencia consenso diferente **(Fig. 28-3)**. Estos promotores controlan la expresión de un conjunto de genes que codifican proteínas, incluidas algunas chaperonas que forman parte de un sistema inducido por estrés denominado respuesta al choque térmico. Por tanto, la coordinación de la regulación de un conjunto de genes que intervienen en procesos relacionados es el resultado de los cambios de afinidad de unión de la polimerasa, que la dirigen hacia diferentes promotores. En células eucariotas, algunos de los factores de transcripción generales, en especial la proteína de unión a TATA (TBP; véase la Fig. 26-9), pueden considerarse factores de especificidad.

Los represores se unen a sitios específicos del DNA. En células bacterianas, esos sitios de unión, denominados **operadores**, se encuentran generalmente cerca de un promotor. La unión de la RNA polimerasa, o su movimiento a lo largo del DNA después de la



FIGURA 28-3 Secuencia consenso de los promotores que regulan la expresión de los genes del choque térmico de *E. coli*. Este sistema responde ante incrementos de temperatura y otras situaciones de estrés ambiental mediante inducción de una serie de proteínas. La unión de la RNA polimerasa a los promotores del choque térmico se realiza mediante una subunidad σ especializada de la polimerasa, σ^{32}, que reemplaza a σ^{70} en el complejo de inicio de la RNA polimerasa.

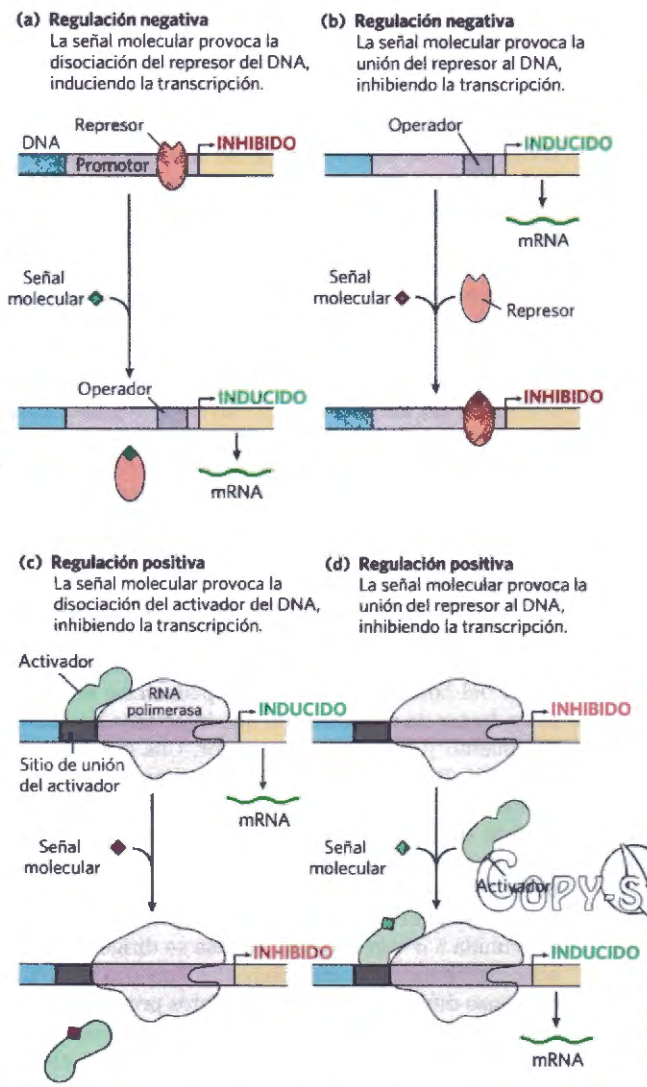


FIGURA 28-4 Patrones comunes de regulación del inicio de la transcripción. Se muestran dos tipos de regulación negativa. **(a)** El represor se une al operador en ausencia de la señal molecular; la señal externa provoca la disociación del represor que permite la transcripción. **(b)** El represor se une en presencia de la señal; el represor se disocia y la transcripción tiene lugar cuando se elimina la señal. La regulación positiva tiene lugar a través de activadores génicos. De nuevo se muestran dos modalidades. **(c)** El activador se une en ausencia de la señal molecular y tiene lugar la transcripción; cuando se añade la señal, el activador se disocia y se inhibe la transcripción. **(d)** El activador se une en presencia de la señal; solamente se disocia cuando se elimina la señal. Observe que regulación "positiva" y "negativa" se refieren al tipo de proteína reguladora implicada: la proteína unida facilita o inhibe la transcripción. En cualquiera de los casos, la presencia de la señal molecular puede aumentar o disminuir la transcripción, según sea su efecto sobre la proteína reguladora.

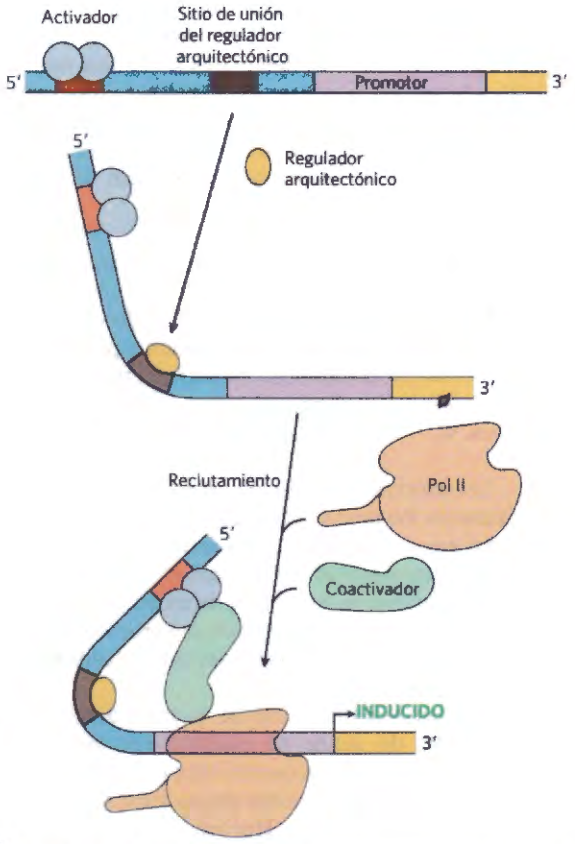


FIGURA 28-5 Interacción entre activadores/represores y la RNA polimerasa en eucariotas. Los activadores y represores eucarióticos a menudo se unen a sitios alejados millares de pares de bases de los promotores que regulan. La formación de un lazo en el DNA, a menudo facilitada por reguladores arquitectónicos, junta los sitios. Tal como se muestra, la interacción entre los activadores y la RNA polimerasa es mediada por los coactivadores. La represión a veces se debe a represores (descritos más adelante) que se unen a los activadores, impidiendo la interacción activadora con la RNA polimerasa.

Copy Station

unión, se bloquea cuando el represor está presente. La regulación mediante una proteína represora que bloquea la transcripción se denomina **regulación negativa**. La unión del represor al DNA se regula por una señal molecular (o **efector**), normalmente una molécula o una proteína pequeña, que se une al represor y provoca un cambio conformacional. La interacción entre el represor y la molécula señal tanto puede aumentar como disminuir la transcripción. En algunos casos, el cambio conformacional provoca la disociación de un represor unido al DNA del operador **(Fig. 28-4a)**. El inicio de la transcripción puede entonces proceder libremente. En otros casos, la interacción entre un represor inactivo y la molécula señal hace que el represor se una al operador (Fig. 28-4b). En las células eucariotas, la regulación génica por represor es menos común. Donde ocurre (más a menudo en eucariotas inferiores como las levaduras), el sitio de unión de un represor puede encontrarse a cierta distancia del promotor. La unión de estos represores a sus sitios de unión tiene el mismo efecto que en las células bacterianas: la inhibición de la formación o de la actividad de un complejo de transcripción en el promotor.

Los activadores constituyen el contrapunto molecular de los represores; se unen al DNA y *potencian* la actividad de la RNA polimerasa en el promotor; es la **regulación positiva**. En las bacterias, los sitios de unión de los activadores se encuentran a menudo adyacentes a promotores a los que la RNA polimerasa o bien no se une por sí sola o lo hace débilmente, de manera

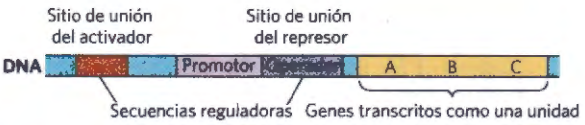


FIGURA 28-6 Un operón bacteriano representativo. Los genes A, B y C se transcriben en un mRNA policistrónico. Las secuencias reguladoras típicas incluyen sitios de unión para proteínas que activan o reprimen la transcripción a partir del promotor.

que en ausencia de activador la trascripción es escasa. Algunos activadores están normalmente unidos al DNA potenciando la transcripción hasta que la unión de una molécula señal provoca la disociación del activador (Fig. 28-4c). En otros casos, el activador se une al DNA sólo después de la interacción con una molécula señal (Fig. 28-4d). Las moléculas señal pueden, por tanto, aumentar o disminuir la transcripción según cómo afecten al activador.

La regulación positiva por activadores es particularmente común en eucariotas. Muchos activadores eucarióticos se unen a sitios del DNA denominados potenciadores, que se encuentran lejos del promotor, afectando la tasa de transcripción de un promotor que puede estar localizado a miles de pares de bases de distancia.

La distancia entre los sitios de unión de activadores y represores y los promotores se salva mediante la formación de un lazo por el DNA que los separa **(Fig. 28-5)**. La formación del lazo se ve facilitada en algunos casos por proteínas denominadas **reguladores arquitectónicos,** que se unen a sitios intermedios. La interacción propiamente dicha entre los activadores y la RNA polimerasa en el promotor está mediada por proteínas de intermediación, denominadas coactivadores. En algunos casos, represores proteicos pueden ocupar el lugar de los coactivadores, uniéndose a los activadores e impidiendo la interacción activadora.

Muchos genes bacterianos están agrupados y se regulan en operones

Las bacterias tienen un mecanismo general sencillo para coordinar la regulación de los genes que codifican productos implicados en una serie de procesos relacionados: estos genes están agrupados en el cromosoma y se transcriben juntos. Muchos mRNA bacterianos son policistrónicos (múltiples genes en un único transcrito) y el promotor único que inicia la transcripción del grupo es el sitio de regulación para la expresión de todos los genes del grupo. El grupo de genes y el promotor, más secuencias adicionales que funcionan conjuntamente en la regulación, se denomina **operón (Fig. 28-6)**. Es habitual que los operones incluyan de dos a seis genes transcritos como una unidad; algunos operones contienen 20 o más genes. La identidad y el orden de los genes en un operón no son aleatorios. En muchas ocasiones, los genes de un mismo operón codifican subunidades de un complejo proteico más grande, y la co-traducción permite directamente el ensamblaje del complejo. Algunos operones organizan genes involucrados en procesos relacionados que requieren una regulación coordinada. En otros casos, los genes podrían no parecer relacionados, pero codifican productos requeridos por la célula bajo condiciones similares.



François Jacob, 1920–2013
[Fuente: Corbis/Bettmann.]



Jacques Monod, 1910–1976
[Fuente: Corbis/Bettmann.]

Muchos de los principios de la expresión génica bacteriana fueron definidos por primera vez gracias a los estudios del metabolismo de la lactosa en *E. coli*, que puede utilizar lactosa como única fuente de carbono. En 1960, François Jacob y Jacques Monod publicaron un breve artículo en los *Proceedings* de la Academia Francesa de Ciencias que describía la forma en que dos genes adyacentes implicados en el metabolismo de la lactosa estaban regulados de forma coordinada por

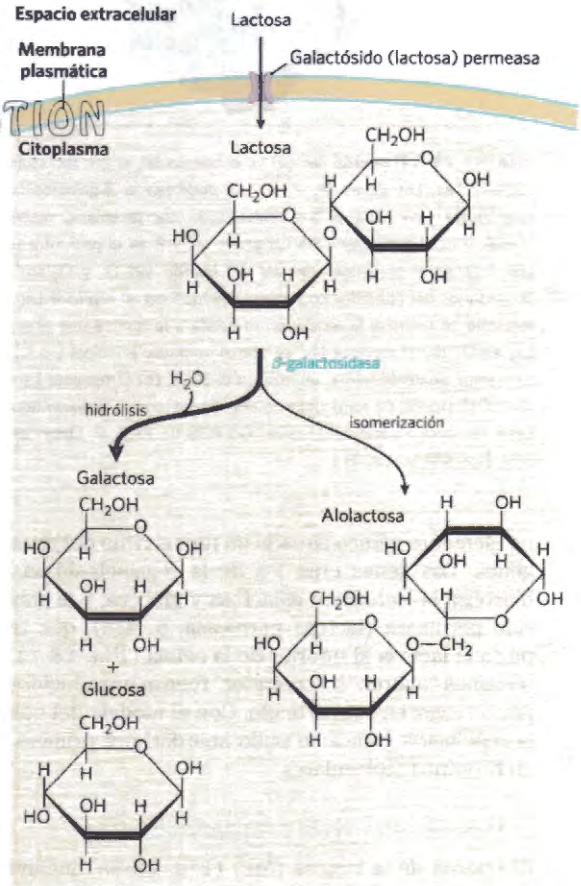


FIGURA 28-7 Metabolismo de la lactosa en *E. coli*. La captación y el metabolismo de la lactosa requieren las actividades de la galactósido (lactosa) permeasa y de la β-galactosidasa. La conversión de la lactosa en alolactosa mediante transglucosilación es una reacción minoritaria también catalizada por la β-galactosidasa.

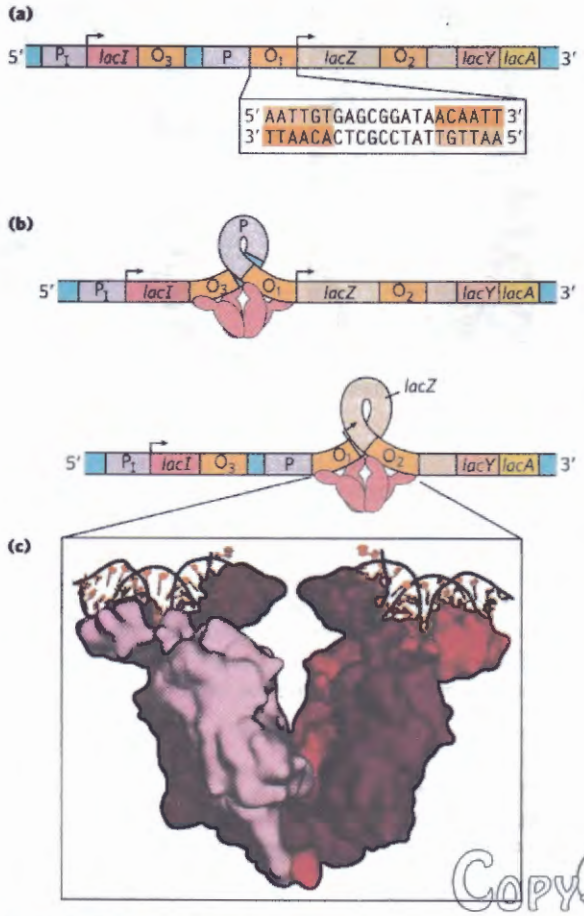


FIGURA 28-8 El operón *lac*. **(a)** En el operón *lac*, el gen *lacI* codifica el represor Lac. Los genes *lac Z*, *Y*, y *A* codifican la β-galactosidasa, la galactósido permeasa y la tiogalactósido transacetilasa, respectivamente. P es el promotor para los genes *lac* y P_I es el promotor para el gen *I*. O_1 es el operador principal del operón *lac*; O_2 y O_3 son sitios secundarios del operador con menor afinidad por el represor Lac. En el recuadro se muestra la repetición invertida a la que se une el represor Lac en O_1. **(b)** El represor Lac se une al operador principal y a O_2 u O_3, formando, aparentemente, un lazo en el DNA. **(c)** El represor Lac (PDB ID 2PE5) (tonos de rojo) unido a segmentos cortos y discontinuos de DNA (en azul y naranja). [Fuente: **(c)** PDB ID 2PE5, R. Daber et al., *J. Mol. Biol.* 370:609,2007]

un elemento génico situado en un extremo del grupo de genes. Los genes eran los de la β-galactosidasa, que hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa, y la galactósido permeasa (lactosa permeasa, p. 418), que transporta la lactosa al interior de la célula **(Fig. 28-7)**. Los términos "operón" y "operador" fueron introducidos por primera vez en este artículo. Con el modelo del operón, la regulación génica se pudo abordar, por primera vez, en términos moleculares.

El operón *lac* está sujeto a regulación negativa

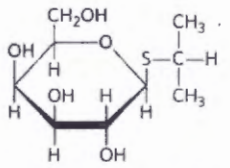
El operón de la lactosa (*lac*) **(Fig. 28-8a)** incluye los genes de la β-galactosidasa (*Z*), la galactósido permeasa (*Y*), y la tiogalactósido transacetilasa (*A*). El último de estos enzimas parece ser que modifica los galactósidos tóxicos para facilitar su eliminación de la célula. Cada uno de los tres genes está precedido por un sitio de unión a ribosomas (no mostrado en la Fig. 28-8), que dirige independientemente la traducción de cada gen (Capítulo 27). La regulación del operón *lac* sigue el modelo mostrado en la Figura 28-4a.

El estudio de los mutantes del operón *lac* ha revelado algunos detalles del funcionamiento del sistema de regulación del operón. En ausencia de lactosa, los genes del operón *lac* están reprimidos. Mutaciones en el operador o en otro gen, el gen *I*, provocan la síntesis constitutiva de los productos génicos. Cuando el gen *I* es defectivo, puede restablecerse la represión mediante la introducción de un gen *I* funcional dentro de la célula en otra molécula de DNA, lo que demuestra que el gen *I* codifica una molécula difundible que provoca la represión génica. Se demostró que esta molécula era una proteína, ahora denominada represor Lac, un tetrámero de monómeros idénticos. El operador al que se une más fuertemente (O_1) es contiguo al sitio de inicio de la transcripción (Fig. 28-8a). El gen *I* se transcribe a partir de su propio promotor (P_I), independientemente de los genes del operón *lac*. El operón *lac* tiene dos sitios de unión secundarios para el represor Lac, O_2 y O_3. O_2 está centrado cerca de la posición +410, dentro del gen que codifica la β-galactosidasa (*Z*); O_3 está cerca de la posición –90, dentro del gen *I*. Para reprimir el operón, el represor Lac parece que se une tanto al operador principal como a uno de los dos sitios secundarios, con el DNA interpuesto formando un lazo (Fig. 28-8b, c). Cualquiera de las dos formas de unión bloquea el inicio de la transcripción.

A pesar de la complejidad del complejo de unión, la represión no es absoluta. La unión del represor Lac reduce la tasa de inicio de la transcripción en un factor de 10^3. Si los sitios O_2 y O_3 se eliminan por deleción o mutación, la unión del represor solamente a O_1 reduce la transcripción en un factor de alrededor de 10^2. Incluso en el estado reprimido, las células tienen unas pocas moléculas de β-galactosidasa y galactósido permeasa, sintetizadas presumiblemente en las raras ocasiones en que el represor se disocia transitoriamente de los operadores. Este nivel basal de transcripción es esencial para la regulación del operón.

Cuando se suministra lactosa a las células, se induce el operón *lac*. Una molécula inductora (señal) se une a un sitio específico del represor Lac, produciendo un cambio conformacional, que provoca la disociación del represor del operador. El inductor en el sistema del operón *lac* no es la propia lactosa sino la alolactosa, un isómero de la lactosa (Fig. 28-7). Una vez en el interior de la célula de *E. coli* (mediante las pocas moléculas de permeasa existentes), la lactosa se convierte en alolactosa por una de las pocas moléculas de β-galactosidasa presentes. La liberación del represor Lac, provocada por la unión de la alolactosa al represor, permite que los genes del operón *lac* se expresen y den lugar a un incremento de 10^3 veces en la concentración de β-galactosidasa.

Varios β-galactósidos relacionados estructuralmente con la alolactosa son inductores del operón *lac*, pero no son sustratos de la β-galactosidasa; otros son sustratos pero no inductores. Un inductor particularmente efectivo y no metabolizable del operón *lac*, que a menudo se utiliza experimentalmente, es el isopropiltiogalactósido (IPTG).



Isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG)

Un inductor que no se pueda metabolizar permite estudiar la función fisiológica de la lactosa como fuente de carbono para el crecimiento, con independencia de su función en la regulación de la expresión génica.

Además de la multitud de operones conocidos actualmente en bacterias, se han encontrado unos cuantos operones policistrónicos en células de eucariotas inferiores. En las células de eucariotas superiores, en cambio, casi todos los genes que codifican proteínas se transcriben separadamente.

El mecanismo de regulación de los operones puede diferir significativamente del modelo sencillo presentado en la Figura 28-8. Incluso el operón *lac* es más complejo de lo que se ha indicado aquí, pues un activador también contribuye al esquema general, tal como veremos en la Sección 28.2. Antes de continuar con la discusión de los niveles de regulación de la expresión génica, examinaremos las interacciones moleculares fundamentales entre las proteínas que se unen al DNA (tales como represores y activadores) y las secuencias de DNA a las que se unen.

Las proteínas reguladoras tienen dominios independientes de unión al DNA

Las proteínas reguladoras se unen generalmente a secuencias específicas de DNA. Sus afinidades por estas secuencias diana son aproximadamente de 10^4 a 10^6 veces mayores que sus afinidades por cualquier otra secuencia de DNA. La mayoría de proteínas reguladoras tienen dominios independientes de unión al DNA que contienen subestructuras que interaccionan exacta y específicamente con el DNA. Estos dominios de unión incluyen, por lo general, uno o más grupos relativamente pequeños de motivos estructurales reconocibles y característicos.

Para unirse específicamente a las secuencias del DNA, las proteínas reguladoras tienen que reconocer características de superficie del DNA. La mayoría de los grupos químicos que distinguen las cuatro bases y permiten la discriminación entre pares de bases son grupos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno que se encuentran expuestos en el surco mayor del DNA **(Fig. 28-9)**, y la mayoría de los contactos proteína-DNA que confieren especificidad son enlaces de hidrógeno. Una excepción notable es la superficie no polar cerca del C-5 de las pirimidinas, donde la timina se distingue fácilmente de la citosina por su grupo metilo protuberante. Los contactos proteína-DNA también son posibles en el surco menor del DNA, pero en este caso los patrones de enlaces de hidrógeno no permiten generalmente una fácil discriminación entre pares de bases.

Dentro de las proteínas reguladoras, las cadenas laterales de los aminoácidos que más a menudo forman enlaces de hidrógeno con las bases del DNA son las de Asn, Gln, Glu, Lys, y Arg. ¿Existe un código de recono-

COPY-STATION

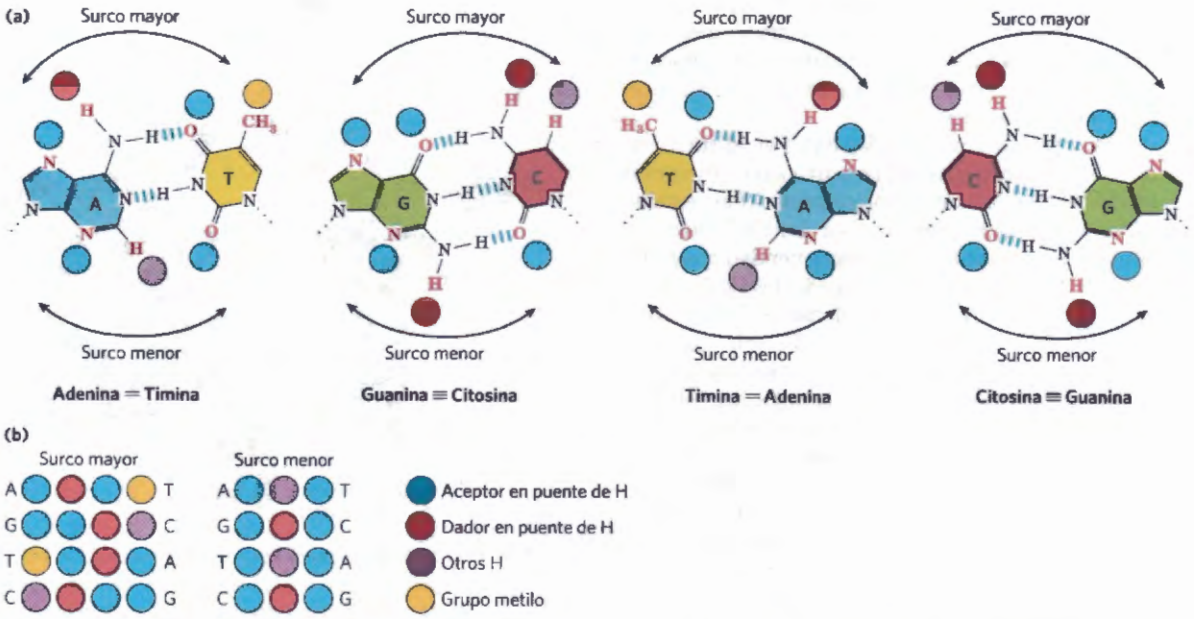


FIGURA 28-9 Grupos en el DNA disponibles para la unión de proteínas. (a) Aquí se muestran los grupos funcionales de los cuatro pares de bases que están expuestos en los surcos mayor y menor del DNA (véase la Fig. 8-13). Los átomos aceptores y dadores en puentes de hidrógeno están indicados por discos azules y rojos, respectivamente. Otros átomos de hidrógeno están indicados en discos púrpura y los grupos metilo en discos amarillos. **(b)** Los patrones de reconocimiento para cada par de bases, de izquierda a derecha, están indicados en la parte inferior. La mucha mayor variación de los patrones del surco mayor da lugar a una mayor discriminación en el surco mayor que en el menor. [Fuente: Información de J. L. Huret, Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol., 2006, http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNAEngID3000ES.html.]

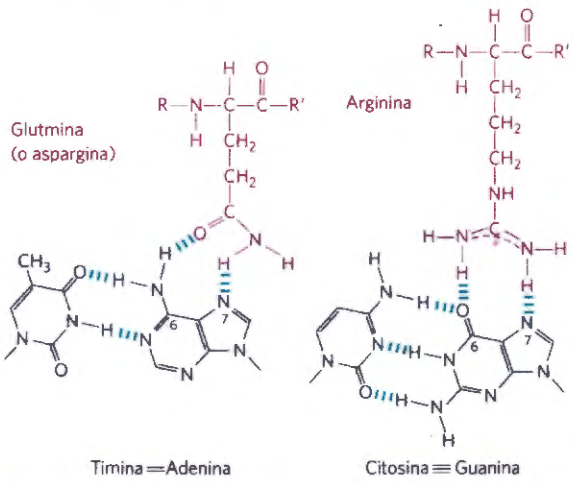


FIGURA 28-10 Interacciones específicas entre un residuo aminoácido y un par de bases. Los dos ejemplos mostrados se han observado en uniones DNA-proteína.

cimiento simple en el que un aminoácido particular siempre se aparee con una base particular? Los dos enlaces de hidrógeno que se pueden formar entre Gln o Asn y las posiciones N^6 y N-7 de la adenina no se pueden formar con ninguna otra base, mientras que un residuo Arg puede formar dos enlaces de hidrógeno con el N-7 y el O^6 de la guanina **(Fig. 28-10)**. El examen de las estructuras de muchas proteínas de unión al DNA ha mostrado, no obstante, que una proteína puede reconocer cada par de bases de más de una manera, lo cual ha llevado a la conclusión de que no existe un código de reconocimiento simple de un aminoácido por una base. En algunas proteínas, la interacción Gln-adenina puede especificar el par de bases A=T, pero en otras el reconocimiento de los pares de bases A=T depende de una cavidad de van der Waals para el grupo metilo de la timina. Todavía no es posible examinar la estructura de una proteína de unión al DNA y deducir la secuencia de DNA a la que se une.

Para interaccionar con las bases en el surco mayor del DNA, una proteína requiere una subestructura relativamente pequeña que sobresalga de forma estable de la superficie de la proteína. Los dominios de unión al DNA de las proteínas reguladoras tienden a ser pequeños (de 60 a 90 residuos aminoácidos) y los motivos estructurales dentro de estos dominios que están efectivamente en contacto con el DNA son todavía más pequeños. Muchas proteínas pequeñas son inestables debido a su limitada capacidad para formar estructuras estratificadas que oculten los grupos hidrofóbicos. Los motivos de unión al DNA o forman una estructura estable muy compacta o facilitan que un segmento forme una protuberancia en la superficie de la proteína.

Los sitios de unión al DNA de las proteínas reguladoras son a menudo repeticiones invertidas de una secuencia de DNA corta (un palíndromo) a la que múltiples subunidades (normalmente dos) de una proteína reguladora se unen cooperativamente. El represor Lac es inusual, pues funciona como un tetrámero, con dos dímeros unidos por los extremos más alejados de los sitios de unión al DNA (Fig. 28-8b). Una célula de *E. coli* contiene normalmente alrededor de 20 tetrámeros del represor Lac. Cada uno de los dímeros se une separadamente a una secuencia operadora palindrómica en contacto con 17 pb de una región de 22 pb en el operón *lac*. Cada uno de los dímeros puede unirse independientemente a una secuencia operadora, uno se une generalmente a O_1 y el otro a O_2 u O_3 (como en la Figura 28-8b). La simetría de la secuencia del operador O_1 se corresponde con el eje de simetría binario de dos subunidades del represor Lac apareados. El represor Lac tetramérico se une a las secuencias de su operador in vivo con una constante de disociación in vivo estimada de 10^{-10} M. El represor discrimina entre los operadores y otras secuencias en un factor de alrededor de 10^6; por tanto, la unión a estos pocos pares de bases entre los aproximadamente 4,6 millones del cromosoma de *E. coli* es altamente específica.

Se han descrito varios motivos de unión al DNA, pero aquí nos centraremos en dos que juegan un papel principal en la unión al DNA de las proteínas reguladoras: la **hélice-giro-hélice** y el **dedo de zinc**. También consideramos dos otros tipos de estos motivos: el homeodominio y el motivo de reconocimiento de RNA, el cual, como su nombre indica, también se une a RNA; ambos motivos juegan importantes roles en algunas proteínas reguladoras de eucariotas.

Hélice-giro-hélice Este motivo de unión al DNA es crucial para la interacción de muchas proteínas regulado-

COPY-STATION

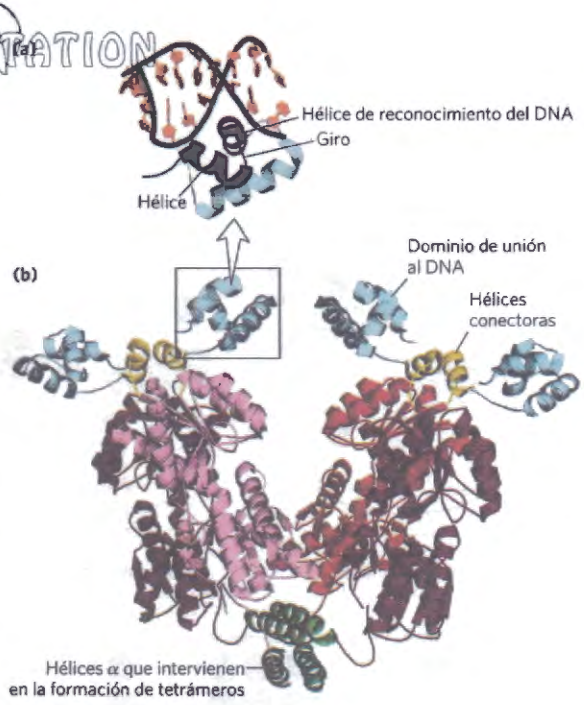


FIGURA 28-11 Hélice-giro-hélice. (a) El dominio de unión al DNA del represor Lac unido al DNA (azul y naranja). El motivo hélice-giro-hélice se muestra en azul oscuro y púrpura; la hélice de reconocimiento del DNA en púrpura **(b)** El represor Lac completo. Los dominios de unión al DNA en azul claro y las hélices α implicadas en la tetramerización en verde. El resto de la proteína (tonos de rojo) tiene el sitio de unión para la alolactosa. Los dominios de unión a la alolactosa están unidos a los dominios de unión al DNA mediante hélices de conexión (en amarillo). [Fuente : PDB ID 2PE5, R. Daber et al., *J. Mol. Biol.* 370:609, 2007.]

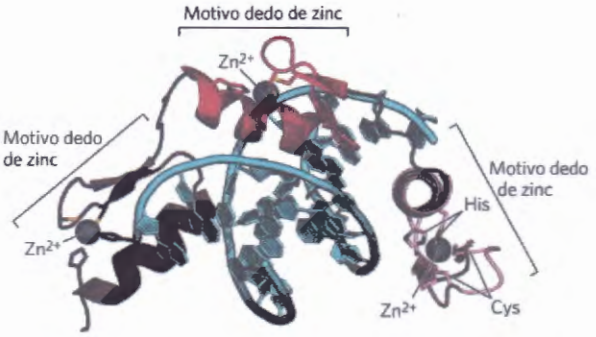


FIGURA 28-12 Dedos de zinc. Tres dedos de zinc (tonos de rojo) de la proteína reguladora Zif268, formando un complejo con el DNA (en azul). Cada Zn^{2+} está coordinado con dos residuos His y dos de Cys. [Fuente: PDB ID 1ZAA, N. P. Pavletich y C.O. Pabo, *Science* 252:809, 1991.]

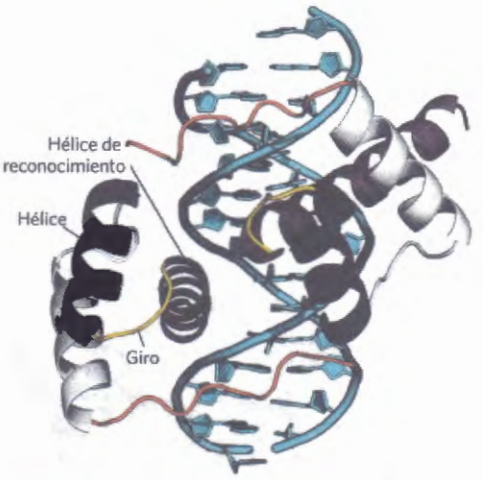


FIGURA 28-13 Homeodominio. Aquí se muestran dos homeodominios unidos al DNA. En cada homeodominio se puede ver una de las hélices α (púrpura), apilada sobre otras dos (azul oscuro y gris), y qaue sobresalen del surco mayor. Esta es solamente una pequeña parte de una proteína de la clase Pax mucho más grande, implicada en la regulación del desarrollo en la mosca del vinagre (véase la Sección 28.3). [Fuente: PDB ID 1FJL, D. D. Wilson et al., *Cell* 82:709,1995.]

ras bacterianas con el DNA; también se han encontrado motivos similares en algunas proteínas reguladoras eucarióticas. El motivo hélice-giro-hélice consta de unos 20 aminoácidos en dos cortos segmentos α-helicoidales, cada uno con siete a nueve residuos aminoácidos de longitud, separados por un giro β **(Fig. 28-11)**. Esta estructura generalmente no es estable por sí sola; es simplemente la porción reactiva de un dominio de unión al DNA algo mayor. Uno de los dos segmentos α-helicoidales se denomina hélice de reconocimiento porque habitualmente contiene muchos de los aminoácidos que interaccionan con el DNA con especificidad de secuencia. Esta hélice β está apilada sobre otros segmentos de la estructura proteica de tal manera que sobresale de la superficie de la proteína. Cuando está unida al DNA, la hélice de reconocimiento se sitúa en el interior o cerca del surco mayor. El represor Lac tiene este motivo de unión al DNA (Fig. 28-11).

Dedo de zinc En un **dedo de zinc**, unos 30 residuos aminoácidos forman un lazo alargado sujeto por su base por un único ión Zn^{2+}, coordinado con cuatro de los residuos (cuatro Cys o dos Cys y dos His). El zinc no interacciona por sí mismo con el DNA; más bien, la coordinación del zinc con los residuos aminoácidos estabiliza este pequeño motivo estructural. Varias cadenas laterales hidrofóbicas en el núcleo de la estructura también contribuyen a la estabilidad. La **Figura 28-12** muestra la interacción entre el DNA y tres dedos de zinc de un único polipéptido de la proteína reguladora Zif 268 del ratón.

Muchas proteínas de unión al DNA eucarióticas poseen dedos de zinc. La interacción de un único dedo de zinc con el DNA es débil, y muchas proteínas que se unen al DNA, tal como Zif268, tienen múltiples dedos de zinc que potencian notablemente la unión interaccionando simultáneamente con el DNA. Una proteína de unión al DNA de la rana *Xenopus* tiene 37 dedos de zinc. Existen pocos ejemplos conocidos de motivos con dedos de zinc en las proteínas bacterianas.

La manera precisa por la que las proteínas con dedos de zinc se unen al DNA varía de una proteína a otra. En unos casos los dedos de zinc contienen residuos aminoácidos que son importantes en la discriminación de secuencias, mientras que en otros parece que se unen al DNA de forma no específica (los aminoácidos requeridos para la especificidad se encuentran en otro lugar de la proteína). Los dedos de zinc también funcionan como motivos de unión al RNA; por ejemplo, ciertas proteínas se unen a mRNA eucarióticos y actúan como represores de la traducción. Este papel se discutirá más adelante (Sección 28.3).

El homeodominio Se ha identificado otro dominio de unión al DNA en algunas proteínas que actúan como reguladores de la transcripción, especialmente durante el desarrollo de los eucariotas. Este dominio de 60 residuos aminoácidos, denominado **homeodominio,** ya que fue descubierto en los genes homeóticos (genes que regulan el desarrollo de los patrones corporales), está altamente conservado y se ha identificado en proteínas de una amplia variedad de organismos, incluidos los humanos **(Fig. 28-13)**. El segmento de unión al DNA del dominio está relacionado con el motivo hélice-giro-hélice. La secuencia de DNA que codifica este dominio se denomina **caja homeo**.

Motivo de reconocimiento de RNA Un dominio de unión a RNA no está fuera de lugar en esta discusión. **Los motivos de reconocimiento de RNA (RRMs)** se encuentran en algunos activadores de genes eucarióticos, donde pueden tener una doble función de unión tanto a DNA como a RNA. Cuando se unen a lugares específicos del DNA, estos activadores inducen la transcripción. Los mismos activadores están a veces regulados en parte por lncRNAs específicos que compiten por la unión al DNA y reducen la transcripción génica. Otras proteínas con RRMs se unen a mRNA, rRNA, o cualquiera de la gama de RNAs pequeños no-codificantes. El RRM consiste en 90 a 100 aminoácidos, dispuestos en una hoja beta antiparalela de cuatro hilos intercalada contra dos hélices alfa, con una tipología β_1-α_1-β_2-β_3-α_2-β_4 **(Fig. 28-14)**. Este motivo puede estar presente

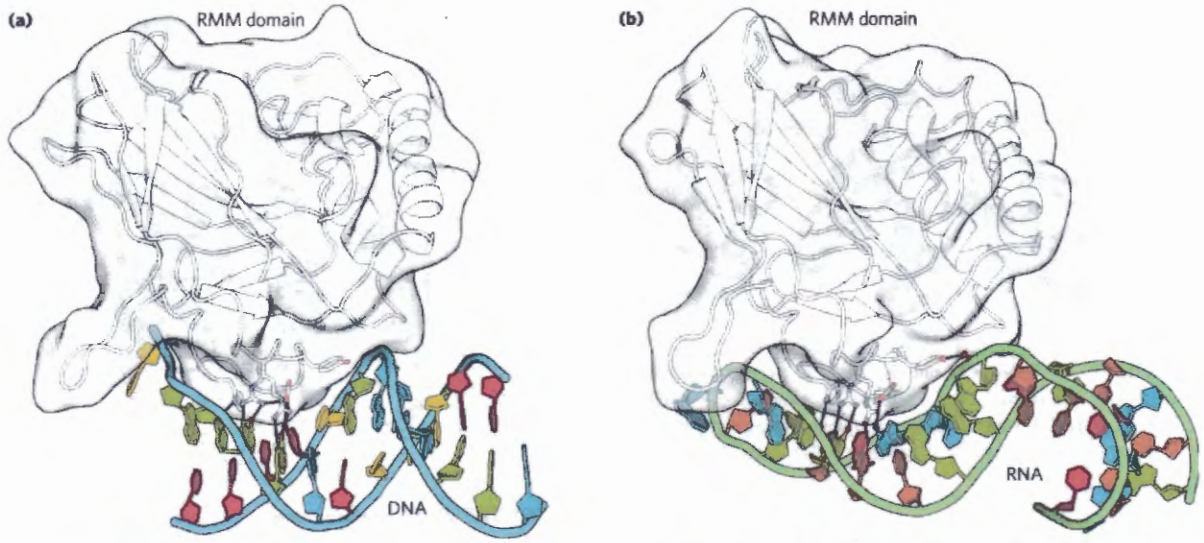


FIGURA 28-14 Motivos de reconocimiento de RNA (RRMs). Se muestra un RRM de la subunidad p50 de la proteína reguladora NF-kB, unida a **(a)** DNA y **(b)** RNA. Las interacciones de enlaces de hidrógeno entre residuos aminoacídicos particulares y las bases de DNA o RNA se muestran con líneas negras. NF-kB es el nombre de una familia de factores de transcripción eucariotas estructuralmente relacionados que regulan procesos desde respuestas inmunes e inflamatorias, hasta crecimiento celular y apoptosis. [Fuentes: **(a)** PDB ID 1OOA, D. B. Huang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:9268, 2003. **(b)** PDB ID 1VKX, F.E. Chen et al., *Nature* 391:410, 1998.]

como parte de proteínas reguladoras de unión al DNA que también tienen otros motivos de unión al DNA, o pueden ocurrir en proteínas que se unen únicamente al RNA.

Las proteínas reguladoras también tienen dominios de interacción proteína-proteína

Las proteínas reguladoras contienen dominios no sólo para la unión al DNA sino también para interacciones proteína-proteína: con la RNA polimerasa, otras proteínas reguladoras u otras subunidades de la misma proteína reguladora. Entre ellas, se cuentan muchos factores de transcripción eucarióticos que funcionan como activadores génicos, que a menudo se unen al DNA como dímeros, utilizando dominios de unión al DNA que contienen dedos de zinc. Algunos dominios estructurales están implicados en las interacciones necesarias para la formación de dímeros que, generalmente, es un requisito previo para la unión al DNA. Como en los motivos de unión al DNA, los motivos estructurales que intervienen en las interacciones proteína-proteína forman parte, habitualmente, de alguna entre unas pocas categorías. Dos ejemplos importantes son la **cremallera de leucina** y la **hélice-lazo-hélice básica**. Los motivos estructurales de este tipo son el fundamento de la clasificación de algunas proteínas reguladoras en familias estructurales.

La cremallera de leucina La **cremallera de leucina** consiste en una hélice α anfipática con una serie de residuos aminoácidos hidrofóbicos concentrados en un lado **(Fig. 28-15)**, con la superficie hidrofóbica formando el área de contacto entre los dos polipéptidos del dímero. Una característica notable de estas hélices α es la existencia de residuos de Leu en cada séptima posición, formando una línea recta a lo largo de la superficie hidrofóbica. Aunque inicialmente se pensó que los residuos de Leu estaban interdigitados (de ahí el nombre de "cremallera"), ahora sabemos que se alinean uno al lado de otro en las hélices α que interaccionan enrollándose una en torno de la otra (formando una hélice espiralada; Fig. 28-15b). Las proteínas reguladoras con cremalleras de leucina suelen tener un dominio de unión al DNA separado con una elevada concentración de residuos básicos (Lys o Arg), que pueden interaccionar con los fosfatos cargados negativamente del esqueleto del DNA. Las cremalleras de leucina se han encontrado en muchas proteínas eucarióticas y en algunas proteínas bacterianas.

COPYRIGHTED MATERIAL

Hélice-lazo-hélice básica Otro motivo estructural frecuente, la **hélice-lazo-hélice básica**, se da en algunas proteínas reguladoras eucarióticas implicadas en el control de la expresión génica durante el desarrollo de los organismos multicelulares. Estas proteínas comparten una región conservada de unos 50 residuos aminoácidos importantes tanto en la unión al DNA como en la dimerización de las proteínas. Esta región puede formar dos hélices α anfipáticas cortas unidas por un lazo de longitud variable, la hélice-lazo-hélice (diferente del motivo hélice-giro-hélice, implicado en la unión al DNA). Los motivos hélice-lazo-hélice de dos polipéptidos interaccionan para formar dímeros **(Fig. 28-16)**. En la unión al DNA de estas proteínas interviene una corta secuencia de aminoácidos adyacente con abundantes residuos básicos, similar a la región de unión al DNA separada de las proteínas que contienen cremalleras de leucina.

Interacciones proteína-proteína en las proteínas reguladoras eucarióticas La mayoría de genes de los eucariotas están regulados por activadores y la mayoría son monocistrónicos. Si fuese necesario un activador diferente para cada gen, el número de activadores (y de genes que los codifican) debería ser equivalente al número de

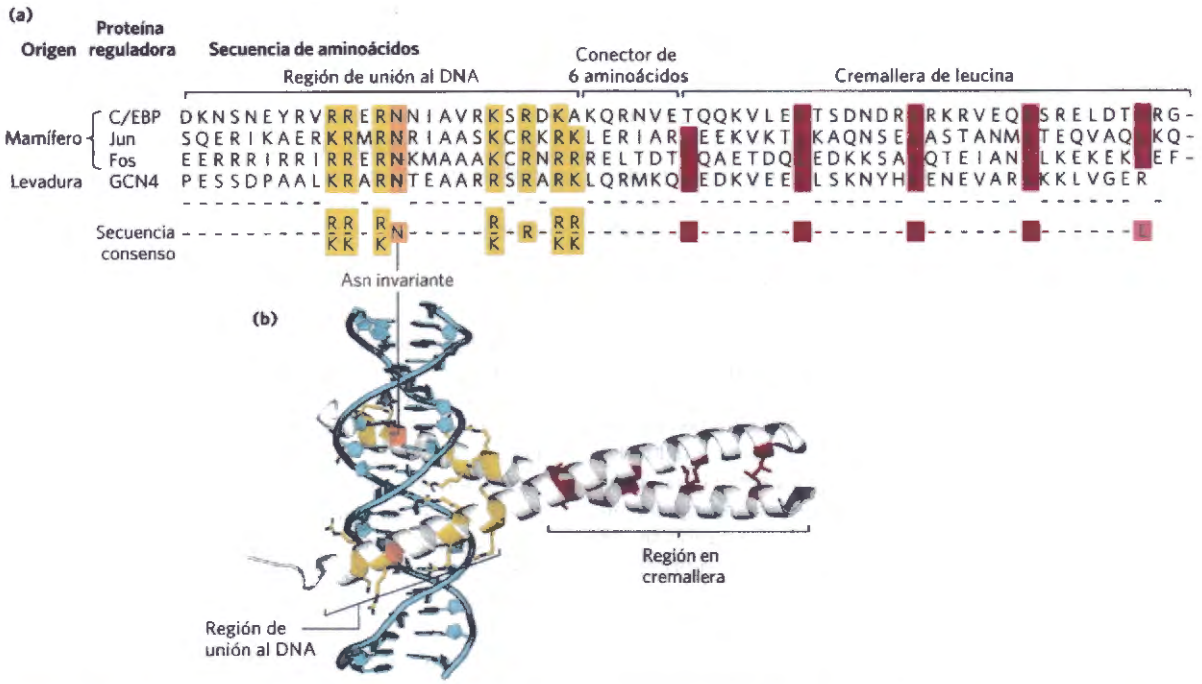


FIGURA 28-15 Cremalleras de leucina. (a) Comparación de las secuencias de aminoácidos de varias proteínas con cremalleras de leucina. Observe los residuos Leu **(L)** (en rojo) que se encuentran en cada séptima posición de la región de la cremallera y el número de residuos Lys **(K)** y Arg **(R)** en la región de unión al DNA (en amarillo). **(b)** (PDB ID 1YSA) Cremallera de leucina de la proteína activadora GCN4 de levadura. Sólo se muestran las hélices α "en cremallera" (rojo). [Fuente: **(a)** Información de S. L. McKnight, *Sci. Am.* 264 (Abril):54, 1991. **(b)** PDB ID 1YSA, T. E. Ellenberger et al., *Cell* 71:1223, 1992.]

COPYSTATION

genes regulados. Sin embargo, en levadura unos 300 factores de transcripción (muchos de ellos activadores) son responsables de la regulación de muchos millares de genes. Muchos factores de transcripción regulan la inducción de múltiples genes, pero la mayoría de genes están regulados por múltiples factores de transcripción (por ejemplo, ver Fig. 15-25). La correcta regulación de diferentes genes se consigue utilizando diferentes combinaciones de un repertorio limitado de factores de transcripción para cada gen, fenómeno denominado **control combinatorio**.

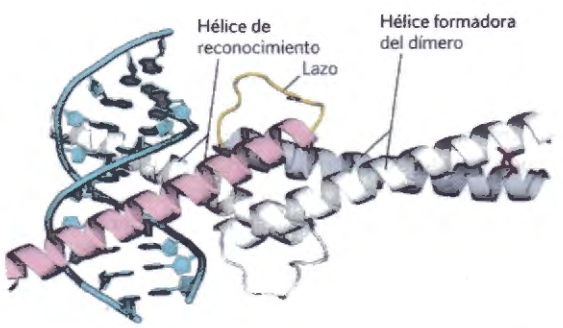


FIGURA 28-16 Hélice-lazo-hélice. (PDB ID 1HLO) El factor de transcripción humano Max, unido a su sitio diana del DNA. La proteína es dimérica; una subunidad está coloreada. La hélice de reconocimiento (rosa) está unida a través del lazo a la hélice que forma el dímero (azul claro), que se solapa con el extremo carboxilo-terminal de la subunidad. La interacción de las hélices carboxilo-terminales de las dos subunidades adoptan la conformación de hélice espiralada, muy similar a la de las cremalleras de leucina (véase la Fig. 28-15b), pero con un solo par de residuos Leu interaccionando (las cadenas laterales en rojo de la derecha) en este ejemplo particular. El conjunto de la estructura se denomina a veces motivo hélice-lazo-hélice/cremallera de leucina. [Fuente: PDB ID 1HLO, P. Brownlie et al., *Structure* 5:509, 1997.]

El control combinatorio se consigue en parte mezclando y asociando las variantes dentro de una familia de proteínas reguladoras para formar una serie de dímeros proteicos activos. Se han definido varias familias de factores de transcripción eucarióticos sobre la base de estrechas similitudes estructurales. Dentro de cada familia, los dímeros se pueden formar entre dos proteínas idénticas (un homodímero) o entre dos miembros diferentes de la familia (un heterodímero). Una familia hipotética de cuatro proteínas con cremalleras de leucina diferentes podría formar, por tanto, hasta diez especies diméricas distintas. En muchos casos, las diferentes combinaciones tienen distintas propiedades reguladoras y funcionales y actúan en la regulación de genes diferentes. Tal como se verá muchas proteínas reguladoras de este tipo funcionan en la regulación de la mayoría de genes eucarióticos lo que constituye una contribución adicional en el control combinatorio.

Además de los dominios estructurales implicados en la unión al DNA y la dimerización que dirigen una proteína determinada hacia un gen concreto, muchas proteínas reguladoras tienen dominios que han de interaccionar con la RNA polimerasa, con RNAs reguladores, con otras proteínas reguladoras no relacionadas, o

con alguna combinación de las tres. Se han caracterizado al menos tres tipos diferentes de dominios adicionales para la interacción proteína-proteína (principalmente en eucariotas): dominios ricos en glutamina, ricos en prolina y acídicos, cuyos nombres reflejan los residuos aminoácidos que son especialmente abundantes.

Las interacciones de unión proteína-DNA y proteína-RNA son la base de los complejos circuitos reguladores fundamentales para la función génica. A continuación, examinaremos más detalladamente los esquemas de regulación génica, primero en los sistemas bacterianos y después en los eucarióticos.

RESUMEN 28.1 Principios de regulación génica

- La expresión de los genes está regulada por procesos que influyen en la velocidad de síntesis y degradación de los productos génicos. La regulación tiene lugar en buena medida a nivel del inicio de la transcripción en promotores específicos, mediante la intervención de proteínas reguladoras, que pueden tanto reprimir la transcripción (regulación negativa) como activarla (regulación positiva).
- En las bacterias, los genes que codifican productos con funciones interdependientes se encuentran a menudo agrupados en un operón, que actúa como una unidad de transcripción. La transcripción de los genes se bloquea generalmente por la unión de una proteína represora específica en un sitio del DNA denominado operador. Una molécula específica pequeña, un inductor, provoca la disociación del represor del operador. Estos principios se establecieron por primera vez en los estudios del operón lactosa (*lac*). El represor Lac se disocia del operador *lac* cuando el represor se une a su inductor, la alolactosa.
- Las proteínas reguladoras son proteínas de unión al DNA que reconocen secuencias específicas del DNA; la mayoría poseen dominios de unión al DNA característicos. Entre estos dominios, son comunes los motivos estructurales de unión al DNA (y/o al RNA) la hélice-giro-hélice, el dedo de zinc, el homeodominio y el motivo de reconocimiento de RNA.
- Las proteínas reguladoras también contienen dominios de interacción proteína-proteína, entre los que se encuentran la cremallera de leucinas y la hélice-lazo-hélice, que están implicados en la dimerización, y otros motivos responsables de la activación de la transcripción. La mezcla y coincidencia de elementos de familias proteicas para formar factores de transcripción diméricos hace posible una regulación más eficiente y precisa mediante el control combinatorio.

28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias

Como en muchas otras áreas de la investigación bioquímica, el estudio de la regulación de la expresión génica en las bacterias avanzó antes y con mayor rapidez que en otros organismos de experimentación. Los ejemplos de regulación génica bacteriana que aquí se presentan se han escogido entre una serie de sistemas bien estudiados, en parte por su importancia histórica, pero principalmente porque dan una buena visión de la variedad de mecanismos reguladores utilizados por las bacterias. Muchos de los principios de la regulación génica bacteriana son también aplicables a la expresión génica en células eucariotas.

Empezaremos examinando los operones de la lactosa y el triptófano; ambos sistemas tienen proteínas reguladoras, pero los mecanismos generales de regulación son muy diferentes. Seguiremos con una breve discusión de la respuesta SOS en *E. coli*, que ilustra cómo genes dispersos por todo el genoma pueden estar regulados de forma coordinada. Posteriormente describiremos dos sistemas bacterianos muy distintos, que ilustran la diversidad de mecanismos de regulación génica: la regulación de la síntesis de proteínas ribosómicas a nivel de traducción, en la que muchas de las proteínas reguladoras se unen al RNA (en lugar del DNA), y la regulación de un proceso denominado "variación de fase" en *Salmonella*, que es consecuencia de la recombinación genética. Finalmente, examinaremos algunos ejemplos adicionales de regulación postranscripcional en los cuales el RNA modula su propia función.

El Operón *lac* está sujeto a regulación positiva

Las interacciones operador-represor-inductor descritas anteriormente para el operón *lac* (Fig. 28-8) ofrecen un modelo intuitivo satisfactorio de la conexión/desconexión en la regulación de la expresión génica, pero en realidad, la regulación del operón raramente es tan simple. El ambiente de una bacteria es demasiado complejo para que sus genes sean controlados por una sola señal. Otros factores, además de la lactosa, afectan la expresión de los genes *lac*, por ejemplo la disponibilidad de glucosa. La glucosa, metabolizada directamente por glucólisis, es la fuente de energía preferida por *E. coli*. Otros azúcares pueden servir como principal o único nutriente, pero se necesitan etapas enzimáticas extra para preparar su entrada en la glucólisis, que requieren la síntesis de enzimas adicionales. La expresión de genes de proteínas que metabolicen azúcares como la lactosa o la arabinosa es sin duda un derroche si la glucosa es abundante.

¿Qué sucede con la expresión del operón *lac* cuando están presentes tanto la glucosa como la lactosa? Otro mecanismo de regulación, denominado **represión por catabolito**, impide la expresión de los genes para el catabolismo de la lactosa, la arabinosa y otros azúcares en presencia de glucosa, incluso cuando estos azúcares secundarios también están presentes. El efecto de la glucosa está facilitado por el cAMP, como coactivador, y una proteína activadora denominada **proteína receptora de cAMP**, o **CRP** (la proteína se denomina a veces CAP, por *p*roteína *a*ctivadora del gen del *c*atabolito). CRP es un homodímero (M_r de la subunidad 22.000) con sitios de unión para el DNA y el cAMP. La unión está facilitada por un motivo hélice-giro-hélice del dominio de unión al DNA de la proteína **(Fig. 28-17)**. En ausencia de glucosa, la CRP-cAMP se une a un sitio cerca del promotor *lac* **(Fig. 28-18)** y estimula 50 veces la transcripción del RNA. La CRP-cAMP es, por tanto, un elemento de regulación positiva sensible a los niveles de glucosa, mientras que el represor Lac es un elemento de regulación negativa sensible a la lactosa. Los dos actúan

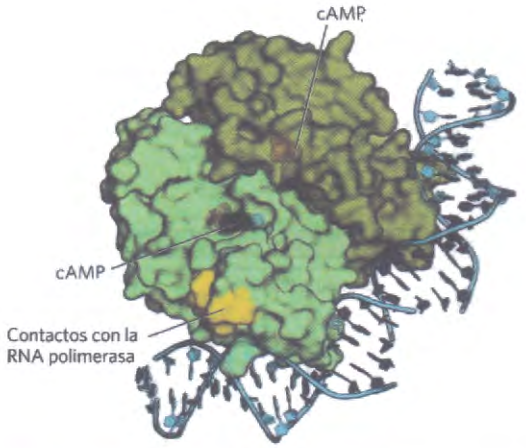


FIGURA 28-17 Homodímero de CRP con cAMP unido. Obsérvese la curvatura del DNA alrededor de la proteína. Está indicada la región que interacciona con la RNA polimerasa (amarillo). [Fuente: PDB ID 1RUN, G. Parkinson et al., *Nature Struct. Biol.* 3:837, 1996.]

conjuntamente. CRP-cAMP tiene poco efecto en el operón *lac* cuando el represor Lac está bloqueando la transcripción y la disociación del represor del operador *lac* tiene poco efecto en la transcripción del operón *lac* a menos que CRP-cAMP esté presente para facilitar la transcripción; cuando la CRP no está unida, el promotor *lac* salvaje es un promotor relativamente débil (Fig. 28-18a, c). El complejo abierto de la RNA polimerasa y el promotor (véase la Fig. 26-6) no se forma fácilmente a menos que esté presente CRP-cAMP. La CRP interacciona directamente con la RNA polimerasa (en la región mostrada en la Fig. 28-17) a través de la subunidad α de la polimerasa

El efecto de la glucosa sobre la CRP está facilitado por la interacción del cAMP (Fig. 28-18). La CRP se une al DNA con mayor afinidad cuando las concentraciones de cAMP son altas. En presencia de glucosa, la síntesis de cAMP está inhibida y se estimula la salida de cAMP de la célula. A medida que desciende la [cAMP], disminuye la unión de la CRP al DNA y, en consecuencia, también disminuye la expresión del operón *lac*. Una fuerte inducción del operón *lac* requiere tanto lactosa (para inactivar el represor *lac*) como una baja concentración de glucosa (para provocar un aumento de la [cAMP] así como de la unión del cAMP a la CRP).

La CRP y el cAMP están implicados en la regulación coordinada de muchos operones, especialmente aquellos que codifican enzimas para el metabolismo de azúcares secundarios tales como la lactosa y la arabinosa. Una red de operones con un regulador común se denomina **regulón**. Esta organización, que permite llevar a cabo cambios coordinados en las funciones celulares, que pueden implicar la acción de centenares de genes, es un tema de gran importancia en la expresión regulada de redes dispersas de genes en eucariotas. Otros regulones bacterianos son el sistema del gen del choque térmico que responde a cambios de temperatura y los genes inducidos en *E. coli* como parte de la respuesta SOS frente a las lesiones del DNA, descritos más adelante.

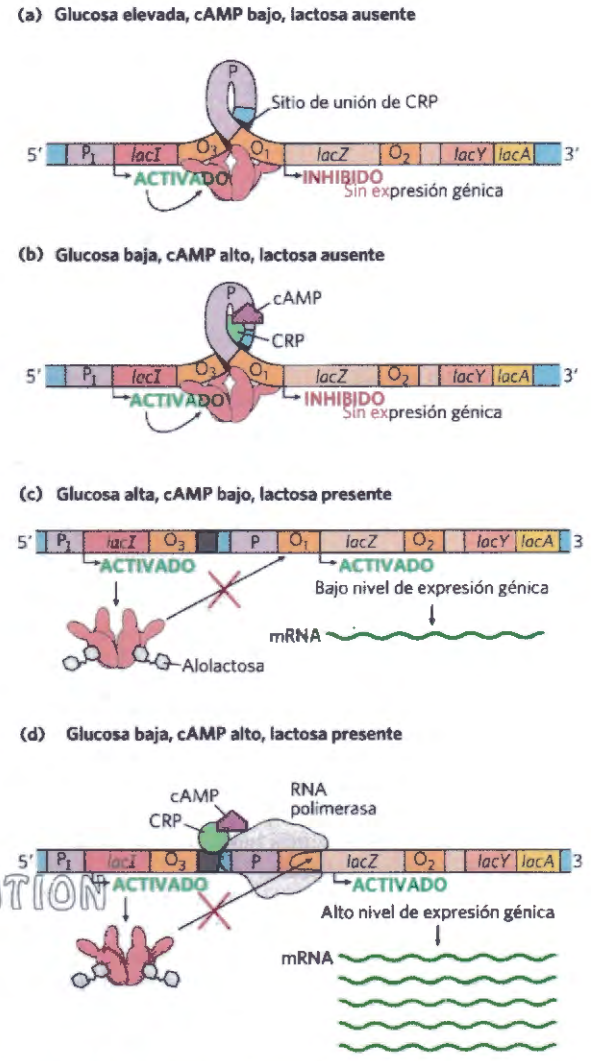


FIGURA 28-18 Regulación positiva del operón *lac* por la CRP. (a) El sitio de unión para la CRP-cAMP está próximo al promotor. Se muestran los efectos combinados de la disponibilidad de glucosa y lactosa en la expresión de operón *lac*. En ausencia de lactosa, el represor se une al operador e impide la transcripción de los genes *lac*. No importa si la glucosa está presente **(a)** o ausente **(b)**. **(c)** Si hay lactosa presente, el represor se disocia del operador. Sin embargo, si también está presente la glucosa, los bajos niveles de cAMP impiden la formación de CRP-cAMP y la unión al DNA. La RNA polimerasa puede unirse esporádicamente e iniciar la trascripción, lo que resulta en un nivel muy bajo de transcripción del gen *lac*. **(d)** En presencia de lactosa y niveles bajos de glucosa, aumenta la concentración de cAMP. Se forma el complejo CRP-cAMP, que facilita la unión fuerte de la RNA polimerasa al promotor *lac* y una elevada tasa de transcripción.

Muchos genes de los enzimas de la biosíntesis de aminoácidos se regulan por atenuación de la transcripción

Los 20 aminoácidos estándar se requieren en grandes cantidades para la síntesis de proteínas y *E. coli* puede sintetizarlos todos. Los genes de los enzimas requeridos para sintetizar un aminoácido dado están agrupados generalmente en un operón y se expresan siempre que el suministro de ese aminoácido sea inadecuado para cubrir las necesidades celulares. Cuando el aminoácido

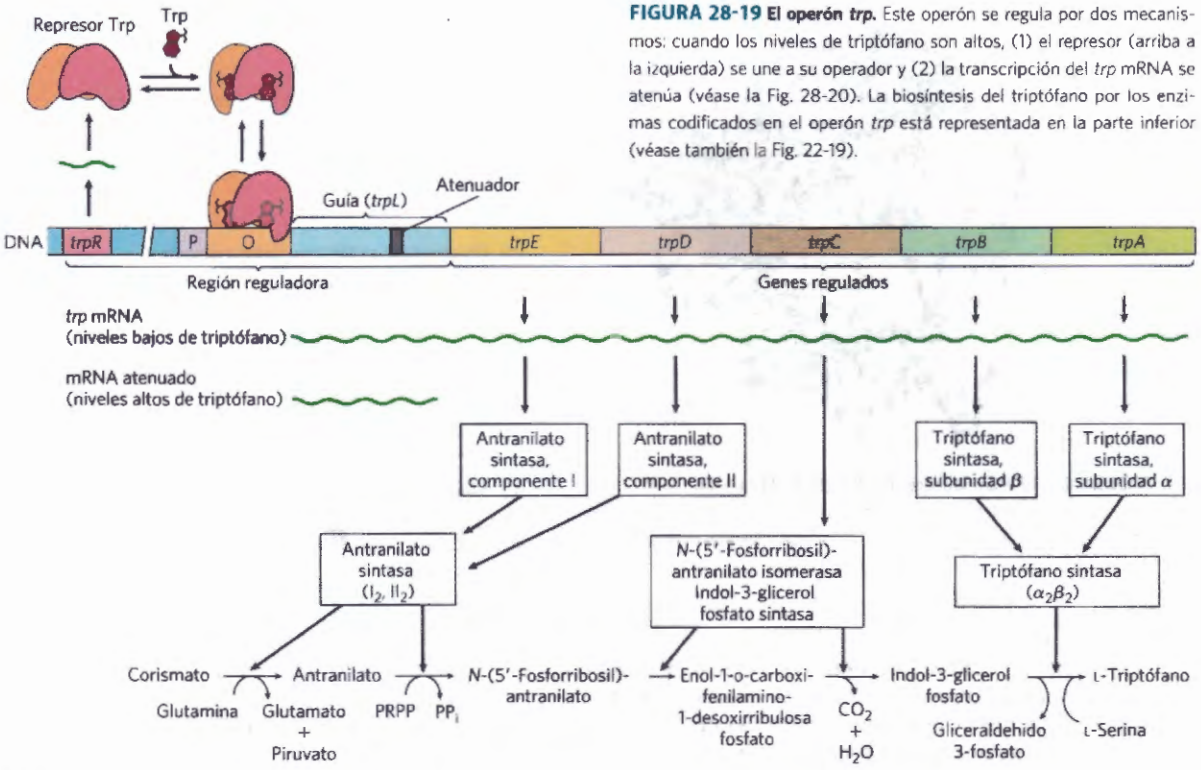


FIGURA 28-19 El operón *trp*. Este operón se regula por dos mecanismos: cuando los niveles de triptófano son altos, (1) el represor (arriba a la izquierda) se une a su operador y (2) la transcripción del *trp* mRNA se atenúa (véase la Fig. 28-20). La biosíntesis del triptófano por los enzimas codificados en el operón *trp* está representada en la parte inferior (véase también la Fig. 22-19).

es abundante, los enzimas biosintéticos no son necesarios y el operón se reprime.

El operón del triptófano (*trp*) de *E. coli* **(Fig. 28-19)** contiene los cinco genes de los enzimas requeridos para convertir el corismato en triptófano. Observe que dos de los enzimas catalizan más de un paso en la vía. El mRNA del operón *trp* tiene una vida media de sólo unos 3 min, lo que permite que la célula responda rápidamente a las necesidades cambiantes de este aminoácido. El represor Trp es un homodímero. Cuando el triptófano es abundante, se une al represor Trp, provocando un cambio conformacional que permite que el represor se una al operador *trp* e inhiba la expresión del operón *trp*. El sitio del operador *trp* se solapa con el promotor, por lo que la unión del represor puede bloquear la unión de la RNA polimerasa.

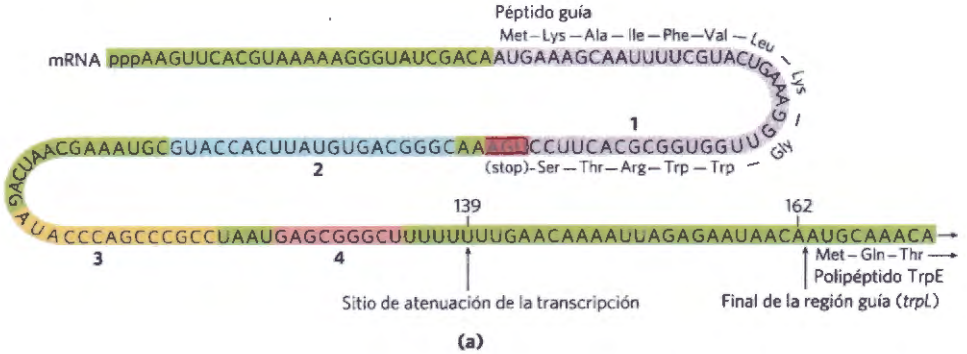
Una vez más, este simple circuito de conexión/desconexión facilitado por un represor no constituye la totalidad del sistema de regulación. Diferentes concentraciones celulares de triptófano pueden variar la velocidad de síntesis de los enzimas biosintéticos en un intervalo de unas 700 veces. Acabada la represión y restablecida la transcripción, la velocidad de transcripción se ajusta con exactitud mediante un segundo proceso de regulación denominado **atenuación de la transcripción**, en el que la transcripción se inicia normalmente, pero se interrumpe bruscamente *antes* de que se transcriban los genes del operón. La frecuencia de atenuación de la transcripción está regulada por la disponibilidad de triptófano y depende del rígido acoplamiento de la transcripción y la traducción en las bacterias.

El mecanismo de atenuación del operón *trp* utiliza señales codificadas en cuatro secuencias dentro de una región **guía** de 162 nucleótidos en el extremo 5' del mRNA que precede al codón de inicio del primer gen **(Fig. 28-20a)**. La guía tiene una región denominada **atenuador**, constituida por las secuencias 3 y 4. Estas secuencias, se aparean para formar una estructura en horquilla rica en G≡C, seguida inmediatamente por una serie de residuos U. La estructura del atenuador actúa como terminador de la transcripción (Fig. 28-20b). La secuencia 2 es un complemento alternativo para la secuencia 3 (Fig. 28-20c). Si se aparean las secuencias 2 y 3, no se puede formar la estructura atenuadora y la transcripción continúa con los genes biosintéticos *trp*; el lazo formado por el apareamiento de las secuencias 2 y 3 no obstaculiza la transcripción.

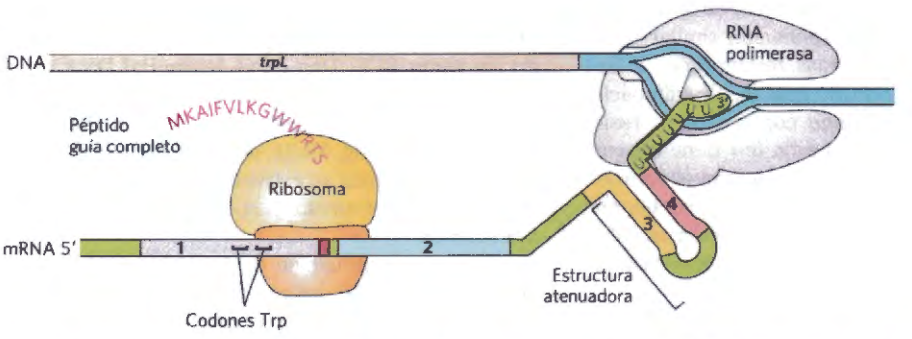
La secuencia reguladora 1 es crucial para el mecanismo sensible al triptófano que determina si la secuencia 3 se aparea con la secuencia 2 (permitiendo que continúe la transcripción) o con la secuencia 4 (atenuando la transcripción). La formación de la estructura atenuadora en horquilla depende de cómo transcurra la *traducción* de la secuencia reguladora 1, que codifica un péptido guía (denominado así porque está codificado por la región guía del mRNA) de 14 aminoácidos, dos de los cuales son residuos Trp. El péptido guía no tiene ninguna otra función celular conocida; su síntesis es simplemente un mecanismo de regulación del operón. Este péptido se traduce inmediatamente después de su transcripción por un ribosoma que sigue de cerca a la RNA polimerasa a medida que avanza la transcripción.

Cuando las concentraciones de triptófano son altas, las concentraciones de tRNA cargados con triptófano ($Trp\text{-}tRNA^{Trp}$) también son altas. Ello permite que la traducción proceda rápidamente, pasando por los dos codones Trp de la secuencia 1 hacia la secuencia 2 antes

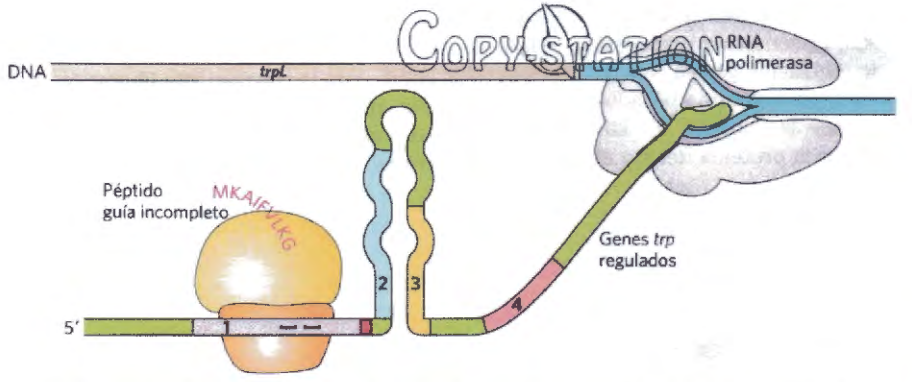
Copy-Station



(a)

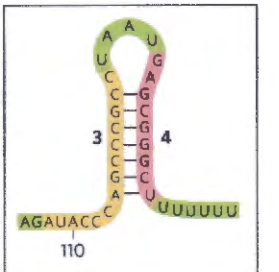


Cuando los niveles de triptófano son altos, el ribosoma traduce rápidamente la secuencia 1 (marco abierto de lectura que codifica el péptido guía) y bloquea la secuencia 2 antes de que se transcriba la secuencia 3. La transcripción continuada conduce a la atenuación en la estructura atenuadora tipo terminador formada por las secuencias 3 y 4.

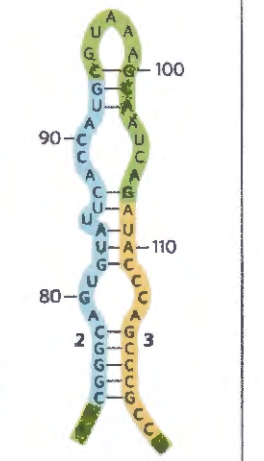


Cuando los niveles de triptófano son bajos, el ribosoma se detiene en los codones Trp de la secuencia 1. La formación de la estructura apareada entre las secuencias 2 y 3 impide la atenuación, debido a que la secuencia 3 ya no está disponible para formar la estructura atenuadora con la secuencia 4. La estructura 2:3, a diferencia del atenuador 3:4, no impide la transcripción.

(b)



Apareamiento 3:4 (atenuador)



Apareamiento 2:3

(c)

FIGURA 28-20 Atenuación transcripcional en el operón *trp*. La transcripción se inicia al principio de la guía de 162 nucleótidos del mRNA codificada por una región de DNA denominada *trpL* (véase la Fig. 28-19). Un mecanismo regulador determina si la transcripción se atenúa al final de la guía o continúa hacia los genes estructurales. **(a)** *trp* mRNA guía (*trpL*). En el mecanismo de atenuación del operón *trp* intervienen las secuencias 1 a 4 (resaltadas). **(b)** La secuencia 1 codifica un péptido pequeño, el péptido guía, que contiene dos residuos Trp **(W)**; se traduce inmediatamente después de que empiece la transcripción. Las secuencias 2 y 3 son complementarias, al igual que las secuencias 3 y 4. La estructura atenuadora se forma mediante el apareamiento de las secuencias 3 y 4 (arriba). Su estructura y función son similares a las de un terminador de la transcripción (véase la Fig. 26-7a). El apareamiento de las secuencias 2 y 3 (abajo) impide que se forme la estructura atenuadora. Obsérvese que el péptido guía no tiene ninguna otra función celular. La traducción de su marco abierto de lectura tiene una función puramente reguladora que determina qué secuencias complementarias (2 y 3 o 3 y 4) se aparearán. **(c)** Esquemas de apareamiento de bases de las regiones complementarias del *trp* mRNA guía.

de que la secuencia 3 sea sintetizada por la RNA polimerasa. Ello provoca que la secuencia 2 quede cubierta por el ribosoma y no pueda aparearse con la secuencia 3 cuando ésta es sintetizada; se forma la estructura atenuadora (secuencias 3 y 4) y se interrumpe la transcripción (Fig. 28-20b, arriba). En cambio, cuando las concentraciones de triptófano son bajas, el ribosoma se atasca en los dos codones Trp de la secuencia 1 porque hay menos $tRNA^{Trp}$ cargado. La secuencia 2 permanece libre mientras se sintetiza la secuencia 3, lo que permite que se apareen estas dos secuencias y se produzca la transcripción (Fig. 28-20b, abajo). De esta manera, la proporción de transcritos que se atenúa desciende a medida que disminuye la concentración de triptófano.

Otros muchos operones biosintéticos de aminoácidos utilizan una estrategia de atenuación similar para adecuar con precisión los enzimas biosintéticos a las necesidades celulares. El péptido guía de 15 aminoácidos producido por el operón *phe* contiene siete residuos Phe. El péptido guía del operón *leu* tiene cuatro residuos Leu contiguos. El péptido guía para el operón *his* contiene siete residuos His contiguos. De hecho, en el operón *his* y en otros muchos, la atenuación es suficientemente sensible por lo que es el único mecanismo de regulación.

La inducción de la respuesta SOS requiere la destrucción de proteínas represoras

Una lesión extensa del DNA en el cromosoma bacteriano provoca la inducción de muchos genes situados a gran distancia. Esta respuesta, denominada respuesta SOS, es otro buen ejemplo de regulación génica coordinada. Muchos de los genes inducidos están implicados en la reparación del DNA (véase la Tabla 25-6). Las proteínas de regulación clave son la proteína RecA y el represor LexA.

El represor LexA (M_r 22.700) inhibe la transcripción de todos los genes SOS **(Fig. 28-21)** y la inducción de la respuesta SOS requiere la eliminación de LexA. No se trata de una simple disociación del DNA en respuesta a la unión de una molécula pequeña, como en la regulación del operón *lac*, descrita anteriormente. Al contrario, el represor LexA se inactiva cuando cataliza su propia rotura en un enlace peptídico Ala-Gly específico, produciendo dos fragmentos proteicos más o menos iguales. A pH fisiológico, esta reacción de autocorte requiere la proteína RecA. RecA no es una proteasa en sentido clásico, pero su interacción con LexA facilita la reacción de autocorte del represor. Esta función de RecA se denomina en ocasiones actividad coproteasa.

La proteína RecA proporciona la conexión funcional entre la señal biológica (lesión del DNA) y la inducción de los genes SOS. Una grave lesión del DNA produce numerosas zonas de DNA monohebra, y sólo RecA unida a DNA monohebra puede facilitar la rotura del represor LexA (Fig. 28-21, abajo). La unión de RecA en esas zonas estimula su actividad coproteasa, que provoca la rotura del represor LexA y la inducción de la respuesta SOS.

Durante la inducción de la respuesta SOS en una célula severamente dañada, RecA también corta y, por tanto, inactiva los represores que, de otro modo, permiten la propagación de ciertos virus en un estado lisogénico latente dentro del huésped bacteriano. Este es un ejemplo notable de adaptación evolutiva. Estos represores, como LexA, también sufren autocorte en un enlace peptídico específico Ala-Gly; por tanto, la inducción de la respuesta SOS permite la replicación del virus y la lisis de la célula, con la consiguiente liberación de nuevas partículas víricas. Por tanto, el bacteriófago puede efectuar una pronta salida de una célula huésped bacteriana en peligro.

Wiley Station

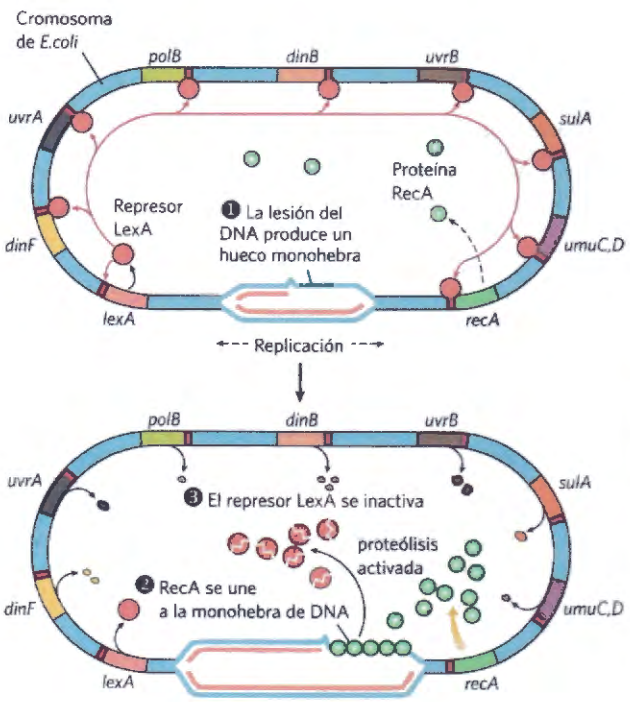


FIGURA 28-21 Respuesta SOS en *E. coli*. Véase la Tabla 25-6 para las funciones de muchas de estas proteínas. La proteína LexA es el represor en este sistema, con un sitio operador (en rojo) cerca de cada gen. La célula normal contiene cerca de 1.000 monómeros de RecA ya que el gen *recA* no está totalmente reprimido por el represor LexA. ❶ Cuando el DNA está extensamente lesionado (p. ej., por luz UV), se detiene la replicación del DNA y aumenta el número de huecos monohebra en el DNA. ❷ La proteína RecA se une a este DNA monohebra lesionado, estimulando la actividad coproteasa de la proteína. ❸ Mientras está unida al DNA, la proteína RecA facilita la hidrólisis e inactivación del represor LexA. Cuando se inactiva el represor, se inducen los genes SOS, incluido *recA*; los niveles de RecA aumentan entre 50 y 100 veces.

La síntesis de proteínas ribosómicas está coordinada con la síntesis de rRNA

En las bacterias, un incremento en la demanda celular de síntesis proteica se satisface mediante el incremento del número de ribosomas en lugar de alterar la actividad de los ribosomas individuales. En general, el número de ribosomas aumenta a medida que aumenta la tasa de crecimiento celular. A tasas altas de crecimiento, los ribosomas constituyen aproximadamente el 45% del peso celular seco. La proporción de recursos celulares dedicados a la producción de ribosomas es tan grande, y la función de los ribosomas es tan importante, que las células tienen que coordinar la síntesis de los componentes ribosómicos: las proteínas (proteínas r) y los RNA (rRNA). Esta regulación es diferente de los mecanismos descritos hasta ahora: tiene lugar principalmente a nivel de *traducción*.

Los 52 genes que codifican las proteínas r se encuentran distribuidos a lo largo de 20 operones como mínimo, cada uno con entre 1 y 11 genes. Algunos de estos operones también contienen los genes de las subunidades de la DNA primasa, la RNA polimerasa y los factores de elongación de la síntesis proteica, lo que explica el estrecho acoplamiento de la replicación, la transcripción y la síntesis proteica durante el crecimiento celular bacteriano.

Los operones de las proteínas r se regulan principalmente mediante un mecanismo de retroalimentación traduccional. Una proteína r codificada por un operón también actúa de **represor traduccional**, uniéndose al mRNA transcrito de su propio operón, bloqueando así la traducción de todos los genes codificados por el mensajero **(Fig. 28-22)**. En general, la proteína r que desempeña el papel de represor también se une directamente a un rRNA. Cada proteína r represora de la traducción se une con mayor afinidad al rRNA apropiado que a su mRNA, por lo que se une al mRNA y la traducción se reprime sólo si el nivel de la proteína r excede al de rRNA. Ello asegura que la traducción de los mRNA que codifican proteínas r sólo se reprima cuando la síntesis de estas proteínas r exceda lo necesario para producir ribosomas funcionales. De esta forma la velocidad de síntesis de proteínas r se mantiene en equilibrio con la disponibilidad de rRNA.

El sitio de unión del mRNA para el represor de la traducción está cerca del sitio de inicio de la traducción de uno de los genes del operón, generalmente el primer gen (Fig. 28-22). En otros operones se vería afectado sólo ese gen en particular, ya que en los mRNA bacterianos policistrónicos la mayoría de genes tienen señales de traducción independientes. Sin embargo, en los operones de proteínas r, la traducción de un gen depende de la traducción de todos los demás. El mecanismo de este acoplamiento de la traducción aún no se conoce en detalle. No obstante, en algunos casos la traducción de múltiples genes parece que se bloquea mediante el plegamiento del mRNA en una estructura tridimensional compleja que se estabiliza tanto por apareamiento interno como por la unión de la proteína represora de la traducción. Cuando el represor de la traducción está ausente, la unión del ribosoma y la traducción de uno o más genes elimina la estructura plegada del mRNA, lo que permite la traducción de los genes.

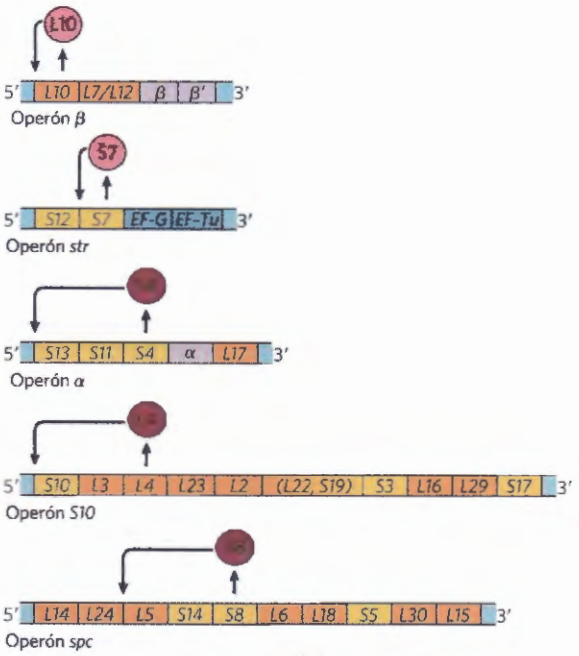


FIGURA 28-22 Retroalimentación traduccional en algunos operones de proteínas ribosómicas. Las proteínas r que actúan como un represor de la traducción están coloreadas en rojo claro. Cada uno de los represores traduccionales bloquea la traducción de todos los genes de este operón, uniéndose al sitio indicado del mRNA. Los genes que codifican las subunidades de la RNA polimerasa están coloreados en púrpura; los genes que codifican los factores de elongación están coloreados en azul. Las proteínas r de la subunidad ribosómica grande (50S) se designan de L1 a L32, las de la subunidad pequeña (30S), de S1 a S21.

Debido a que la síntesis de proteínas r está coordinada con la disponibilidad de los rRNA, la regulación de la producción de ribosomas refleja la regulación de la síntesis de rRNA. En *E. coli*, la síntesis de rRNA a partir de los siete operones de rRNA responde a la tasa de crecimiento celular y a los cambios en la disponibilidad de nutrientes cruciales, especialmente aminoácidos. La regulación coordinada con las concentraciones de aminoácidos se denomina **respuesta severa (Fig. 28-23)**. Cuando las concentraciones de aminoácidos son bajas, cesa la síntesis de rRNA. La deficiencia de aminoácidos provoca la unión de tRNA descargados al sitio A de los ribosomas; ello desencadena una secuencia de acontecimientos que empieza con la unión de un enzima denominado **factor de respuesta severa** (proteína RelA) al ribosoma. Cuando está unido al ribosoma, el factor de respuesta severa cataliza la formación del nucleótido poco común guanosina tetrafosfato (ppGpp); se añade pirofosfato a la posición 3' del GTP, en la reacción

$$\text{GPT} + \text{ATP} \longrightarrow \text{pppGpp} + \text{AMP}$$

A continuación, una fosfohidrolasa elimina un fosfato para formar ppGpp. El aumento brusco del nivel de pppGpp y ppGpp en respuesta a la carencia de aminoácidos produce una gran reducción de la síntesis de rRNA, debida, al menos en parte, a la unión de ppGpp a la RNA polimerasa.

Los nucleótidos pppGpp y ppGpp, junto con el cAMP, pertenecen a una clase de nucleótidos modifica-

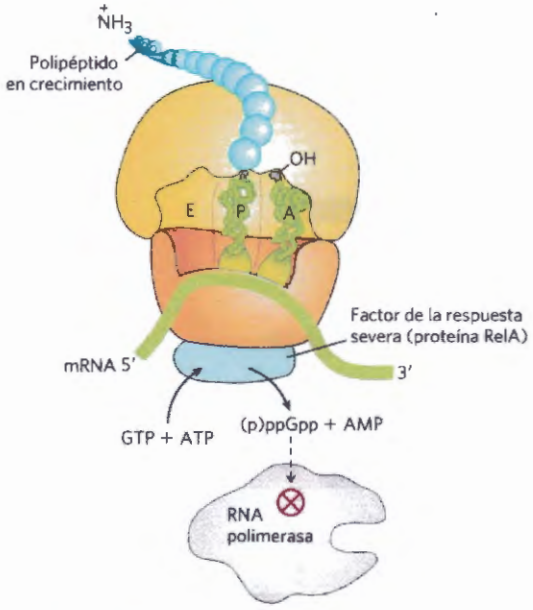


FIGURA 28-23 Respuesta severa en *E. coli*. Esta respuesta a la falta de aminoácidos está provocada por la unión de un tRNA descargado en el sitio A del ribosoma. Una proteína denominada factor de respuesta severa se une al ribosoma y cataliza la síntesis de pppGpp, que se convierte en ppGpp por una fosfohidrolasa. El ppGpp señal reduce la transcripción de algunos genes e incrementa la de otros, en parte al unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa y alterando la especificidad de promotor del enzima. La síntesis de rRNA se reduce cuando los niveles de ppGpp aumentan.

dos que actúan como segundos mensajeros celulares. En *E. coli*, estos dos nucleótidos sirven como señal de carencia de nutrientes, provocan grandes cambios en el metabolismo celular, al aumentar o disminuir la transcripción de centenares de genes. En las células eucariotas, nucleótidos similares que actúan de segundos mensajeros también tienen funciones de regulación múltiples. La coordinación del metabolismo celular con el crecimiento celular es muy compleja y, sin duda, otros mecanismos de regulación están aún por descubrir.

La función de algunos mRNA está regulada por pequeños RNA en cis o en trans

Tal como se describe a lo largo de este capítulo, las proteínas juegan un papel importante y bien documentado en la regulación de la expresión génica. Pero el RNA también juega un papel crucial, cada vez mejor reconocido a medida que se descubren nuevos casos de RNA reguladores. Una vez sintetizado un mRNA, sus funciones pueden ser controladas por proteínas de unión a RNA, como se ha visto en los operones de las proteínas r recién descritos, o por un RNA. Una molécula distinta de RNA puede unirse al mRNA "en trans" y afectar su actividad. Alternativamente, una parte del mismo mRNA puede regular su propia función. Cuando una parte de una molécula afecta la función de otra parte de la misma molécula, se dice que actúa "en cis".

Un ejemplo bien caracterizado de regulación de RNA en trans es la regulación del mRNA del gen *rpoS* (factor sigma de la *R*NA polimerasa), que codifica σ^{38}, uno de los siete factores sigma de *E. coli* (véase la Tabla 26-1). La célula utiliza este factor de especificidad en ciertas situaciones de estrés, tal como la entrada en fase estacionaria (un estado de no crecimiento, forzado por la falta de nutrientes), y σ^{38} es necesario para la transcripción de un gran número de genes de respuesta al estrés. El mRNA de σ^{38} está presente en la mayoría de circunstancias a muy baja concentración, pero no se traduce porque una gran estructura en horquilla más arriba de la región codificante impide su unión al ribosoma **(Fig. 28-24)**. En ciertas condiciones de estrés, se inducen uno o dos RNA pequeños de función especial, DsrA (región *A* corriente abajo) y RprA (RNA *A* regulador de *Rpos*). Ambos pueden aparearse con una de las hebras de la horquilla en el mRNA de σ^{S}, desorganizándola, y, en consecuencia, permitiendo la traducción de *rpoS*. Otro RNA pequeño, OxyS (gen *S* del estrés oxidativo), se induce en condiciones de estrés oxidativo e inhibe la traducción de *rpoS*; probablemente, apareándose con el sitio de unión al ribosoma del mRNA. OxyS se expresa como parte de un sistema que responde a un tipo de estrés (daño oxidativo) distinto del que activa el RNA *rpoS*, y su tarea consiste

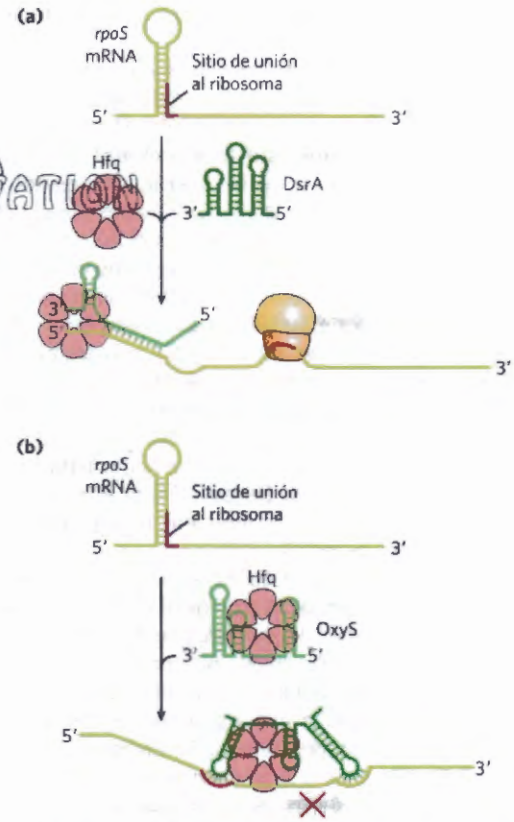


FIGURA 28-24 Regulación en trans de la función de mRNA bacterianos por sRNA. Varios sRNA (RNA pequeños) -DsrA, RprA y OxyS- intervienen en la regulación del gen *rpoS*. Todos requieren la proteína Hfq, una chaperona de RNA que facilita el apareamiento RNA-RNA. La Hfq tiene una estructura toroidal con un orificio en el centro. **(a)** La DsrA activa la traducción apareándose con una hebra de una estructura en horquilla que bloquea el sitio de unión al ribosoma. RprA (no mostrada) actúa de forma similar. **(b)** OxyS bloquea la traducción apareándose con el sitio de unión al ribosoma. [Fuente: Informacion de M. Szymański y J. Barciszewski, *Genome Biol.* 3: reviews0005.1, 2002.]

COPY-STATION

en impedir la expresión de rutas de reparación innecesarias. Dsra, RprA y OxyS son moléculas de RNA bacteriano relativamente pequeñas (menos de 300 nucleótidos), designados como sRNA (*s* por pequeño; obviamente hay otros RNA "pequeños" en los eucariotas con otras designaciones). Todos los sRNAs requieren para su función una proteína denominada Hfq, una chaperona de RNA que facilita el apareamiento RNA-RNA. Los genes bacterianos regulados de esta forma son escasos, tan solo unas pocas docenas en una especie bacteriana típica. Sin embargo, estos ejemplos son buenos modelos para entender los patrones presentes en los casos de regulación mediada por RNA en los eucariotas, más complejos y numerosos.

La regulación en cis pone en juego una clase de estructuras de RNA conocidas como **ribointerruptores**. Tal como se ha descrito en el Recuadro 26-3, los aptámeros son moléculas de RNA generadas in vitro, que son capaces de unirse específicamente a un ligando en particular. Como sería de esperar, tales dominios de RNA de unión a ligandos también se encuentran en la naturaleza, en los ribointerruptores, en un número significativo de mRNA bacterianos (e incluso en algunos mRNA eucarióticos). Estos aptámeros naturales consisten en dominios estructurados localizados en la región 5' no traducida de ciertos mRNA bacterianos. Algunos ribointerruptores también regulan la transcripción de algunos RNAs no codificantes. La unión de un mRNA ribointerruptor al ligando apropiado provoca un cambio conformacional en el mRNA, que inhibe la transcripción mediante la estabilización de una estructura de terminación de la transcripción prematura, o bien se inhibe (en cis) la traducción a consecuencia de la oclusión del sitio de unión al ribosoma **(Fig. 28-25)**. En general, los ribointerruptores actúan como parte de un bucle de retroalimentación. La mayor parte de los genes regulados de esta forma están implicados en la síntesis o el transporte del ligando que se une el ribointerruptor; por tanto, cuando el ligando está presente en elevadas concentraciones, el ribointerruptor inhibe la expresión de los genes necesarios para reponerlo.

Cada ribointerruptor une un solo ligando. Se han encontrado diferentes ribointerruptores que responden a más de una docena de ligandos diferentes, entre los que se encuentran la tiamina pirofosfato (TPP, vitamina B_1), cobalamina (vitamina B_{12}), flavina mononucleótido, lisina, *S*-adenosilmetionina (adoMet), purinas, *N*-acetilglucosamina 6-fosfato, glicina y algunos cationes metálicos como Mn^{2+}. Es probable que se descubran muchos más. El ribointerruptor que responde a TTP parece ser el más difundido; se encuentra en muchas bacterias, hongos y algunas plantas. El ribointerruptor para el TTP bacteriano inhibe la traducción en algunas especies e induce la terminación prematura de la transcripción en otras (Fig. 28-25). El ribointerruptor para el TTP eucariótico se encuentra en los intrones de ciertos genes y modula el corte y empalme alternativo de estos genes (véase la Fig. 26-19b). Todavía no está claro cuán abundantes son los ribointerruptores. Sin embargo, se ha estimado que más del 4% de los genes de *Bacillus subtilis* están regulados por ribointerruptores.

A medida que los ribointerruptores van conociéndose mejor, se están encontrando aplicaciones médicas. Por ejemplo, la mayoría de los ribointerruptores descritos hasta la fecha, incluido el que responde a adoMet, sólo se han encontrado en las bacterias. Un fármaco que se uniese y activase el ribointerruptor adoMet bloquearía los genes que codifican los enzimas que sintetizan y transportan adoMet, privando a las bacterias de este cofactor esencial. Se están investigando fármacos de este tipo para utilizarlos como una nueva clase de antibióticos. ■

El ritmo de los descubrimientos de RNA funcionales no da síntomas de desfallecimiento y continúa apoyando la hipótesis de que el RNA jugó un papel determinante en la evolución de la vida (Capítulo 26). Los sRNA y los ribointerruptores, así como los ribozimas y los ribosomas pueden ser vestigios de un mundo de RNA oscurecido por el tiempo, pero todavía presente en un abundante conjunto de mecanismos biológicos en la biosfera. La selección de aptámeros en el laboratorio y los ribozimas con nuevas funciones enzimáticas y de unión de ligandos (véase el Recuadro 26-3) nos dicen que las actividades basadas en RNA, necesarias para la viabilidad de un mundo de RNA, son posibles. El descubrimiento de las mismas funciones del RNA en organismos distintos sugiere que los componentes clave para un metabolismo basado en el RNA existen efectivamente. Por ejemplo, los aptámeros naturales de los ribointerruptores pueden proceder de los RNA que, hace miles de millones de años, se unían a los cofactores necesarios

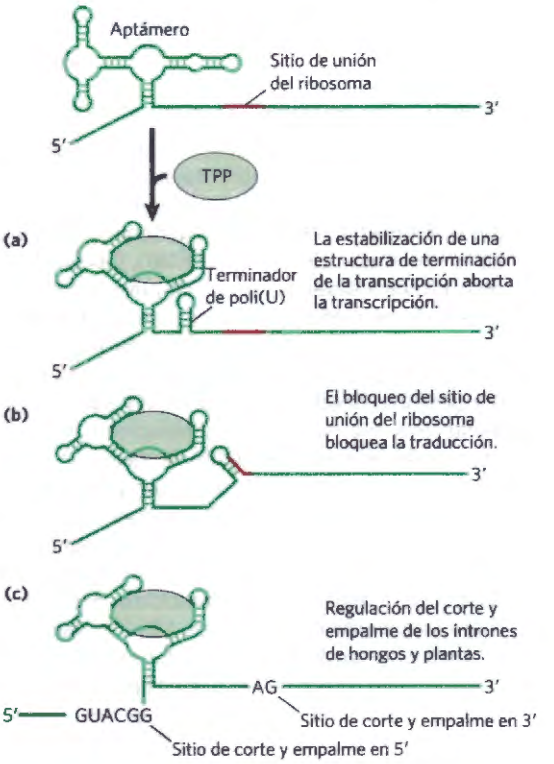


FIGURA 28-25 Regulación en cis de la función de mRNA bacterianos por ribointerruptores. Los modos de acción conocidos se ilustran mediante varios ribointerruptores basados en un aptámero natural ampliamente distribuido que une tiamina pirofosfato. La unión de TTP al aptámero provoca un cambio conformacional que desemboca en los diversos resultados ilustrados en los paneles **(a)**, **(b)** y **(c)** en los diferentes sistemas que utilizan este aptámero. [Fuente: Información de W. C. Winkler y R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* 59:487, 2005.]

Copyrighted

para promover los procesos enzimáticos requeridos por el metabolismo en un mundo de RNA.

Algunos genes se regulan por recombinación genética

Describiremos ahora otro tipo de regulación génica bacteriana, a nivel del reordenamiento del DNA por recombinación. *Salmonella typhimurium*, que vive en los intestinos de los mamíferos, se mueve haciendo girar los flagelos de su superficie celular **(Fig. 28-26)**. Las muchas copias de la proteína flagelina (M_r 53.000) que forman los flagelos son dianas preferentes de los sistemas inmunitarios de los mamíferos. Pero las células de *Salmonella* poseen un mecanismo que elude la respuesta inmune: alternan entre dos proteínas flagelina distintas (FljB y FliC) aproximadamente una vez cada 1.000 generaciones, utilizando un proceso denominado **variación de fase**.

El cambio se produce mediante la inversión periódica de un segmento de DNA que contiene el promotor de un gen de la flagelina. La inversión es una reacción de recombinación específica de sitio (véase la Fig. 25-38) en la que actúa la recombinasa denominada Hin sobre secuencias específicas de 14 pb (secuencias *hix*) en cada uno de los extremos del segmento de DNA. Cuando el segmento de DNA se encuentra en una orientación, se expresan el gen de la flagelina FljB y el gen que codifica un represor (FljA) **(Fig. 28-27a)**; el represor anula la expresión del gen de la flagelina FliC. Cuando el segmento de DNA se invierte (Fig. 28-27b), los genes *fljA* y *fljB* dejan de transcribirse y el gen *fliC* se induce a medida que desaparece el represor. La recombinasa Hin, codificada por el gen *hin* en el segmento de DNA que sufre la inversión, se expresa cuando el segmento de DNA está en cualquier orientación; por tanto, siempre es posible cambiar de un estado a otro.

Este tipo de mecanismo de regulación tiene la ventaja de ser absoluto: la expresión génica es imposible cuando el gen está físicamente separado de su promotor (véase la posición del promotor *fljB* en la Fig. 28-27b).



FIGURA 28-26 ***Salmonella typhimurium.*** Los apéndices que emanan de la superficie son flagelos. [Fuente: Eye of Science / Science Source.]

Un mecanismo de arranque/parada absoluto puede ser importante en este sistema (aunque solamente afecte a uno de los dos genes de la flagelina), porque un flagelo con tan sólo una copia de flagelina incorrecta puede ser vulnerable a los anticuerpos del huésped dirigidos contra esta proteína. El sistema de *Salmonella* no es de ninguna manera único. Se dan sistemas de regulación similares en algunas bacterias y bacteriófagos y se han encontrado sistemas de recombinación con funciones similares en eucariotas (Tabla 28-1). La regulación génica por reordenamientos del DNA que mueven genes y/o promotores es muy frecuente en patógenos que se benefician cambiando su gama de huéspedes o cambiando sus proteínas de superficie, adelantándose de este modo al sistema inmunitario del huésped.

COPY-STATION

RESUMEN 28.2 Regulación de la expresión génica en bacterias

■ Además de la represión por el represor Lac, el operón *lac* de *E. coli* se regula positivamente por la proteína receptora de cAMP (CRP). Cuando la [glucosa] es

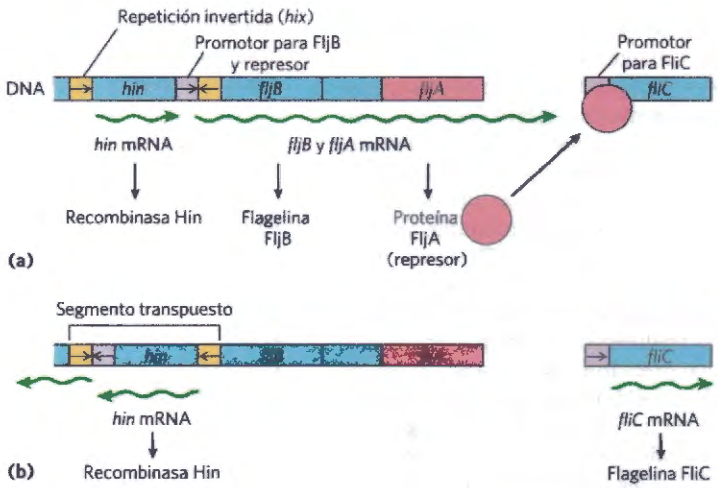


FIGURA 28-27 Regulación de los genes de la flagelina en *Salmonella*: variación de fase. Los productos de los genes *fliC* y *fljB* son flagelinas diferentes. El gen *hin* codifica la recombinasa que cataliza la inversión del segmento de DNA que contiene el promotor *fljB* y el gen *hin*. Los sitios de recombinación (repeticiones invertidas) se denominan *hix* (en amarillo). **(a)** En una orientación, *fljB* se expresa junto con una proteína represora (producto del gen *fljA*) que reprime la transcripción del gen *fliC*. **(b)** En la orientación opuesta sólo se expresa el gen *fliC*; los genes *fljA* y *fljB* no se pueden transcribir. La interconversión entre estos dos estados, denominada variación de fase, también requiere otras dos proteínas de unión al DNA no específicas (no mostradas), HU y FIS.

TABLA 28-1 Ejemplos de regulación génica por recombinación

Sistema	Recombinasa/sitio de recombinación	Tipo de recombinación	Función
Variación de fase (*Salmonella*)	Hin/*hix*	Específica de sitio	La expresión alternativa de dos genes de la flagelina permite eludir la respuesta inmunitaria del huésped.
Gama de huéspedes (bacteriófago μ)	Gin/*gix*	Específica de sitio	La expresión alternativa de dos conjuntos de genes de la fibra de la cola afecta a la gama de huéspedes.
Cambio del tipo de apareamiento (levaduras)	Endonucleasa HO, proteína RAD52, otras proteínas/ *MAT*	Conversión génica no recíproca[a]	La expresión alternativa de dos tipos de apareamiento de levaduras, a y α, crea células con diferentes tipos de apareamiento que se pueden aparear y experimentar meiosis.
Variación antigénica (tripanosomas)[b]	Varía	Conversión génica no recíproca[a]	La expresión sucesiva de diferentes genes que codifican las glucoproteínas de superficie variables (VSG) permite eludir la respuesta inmunitaria del huésped.

[a]En la conversión génica no recíproca (un tipo de proceso de recombinación no discutida en el Capítulo 25), la información genética se traslada de una parte del genoma (donde está silenciada) a otra (donde se expresa). La reacción es similar a la transposición replicativa (véase la Fig. 25-42).

[b]Los tripanosomas causan la enfermedad del sueño africana y otras enfermedades (véase el Recuadro 6-3). La superficie externa de un tripanosoma contiene múltiples copias de un único VSG, el antígeno de superficie principal. Una célula puede cambiar los antígenos de superficie en más de 100 formas diferentes, imposibilitando una defensa efectiva por parte del sistema inmunitario del huésped.

baja, la [cAMP] es alta y la CRP-cAMP se une a un sitio específico del DNA, se estimula la transcripción del operón *lac* y la producción de los enzimas del metabolismo de la lactosa. La presencia de glucosa disminuye la [cAMP], que disminuye la expresión de *lac* y otros genes implicados en el metabolismo de azúcares secundarios. Un grupo de operones regulados de manera coordinada se denomina regulón.

- Los operones de los enzimas de la síntesis de aminoácidos poseen un circuito regulador denominado atenuación, que utiliza un sitio de terminación de la trascripción, denominado atenuador, en el mRNA. La formación del atenuador está modulada por un mecanismo que acopla la transcripción y la traducción en respuesta a pequeños cambios en la concentración de aminoácidos.
- En el sistema SOS, se inducen simultáneamente múltiples genes no ligados reprimidos por un único represor cuando las lesiones del DNA desencadenan el corte autocatalítico del represor asistido por la proteína RecA.
- En la síntesis de las proteínas ribosómicas, una proteína de cada operón de proteína r actúa como represor de la traducción. El represor se une al mRNA, bloqueando la traducción, sólo cuando la proteína r se encuentra en exceso en relación con el rRNA disponible.
- La regulación postranscripcional de algunos mRNA está facilitada por sRNA que actúan en trans o por ribointerruptores, que son parte de la propia estructura del mRNA, que actúan en cis.
- Algunos genes están regulados por procesos de recombinación genética que mueven los promotores en relación con los genes regulados. La regulación también puede tener lugar a nivel de la traducción.

28.3 Regulación de la expresión génica en eucariotas

El inicio de la transcripción es un punto de regulación fundamental de la expresión génica en todos los organismos. A pesar de que los eucariotas y las bacterias utilizan algunos de los mismos mecanismos de regulación, la regulación de la transcripción en los dos sistemas es fundamentalmente distinta.

La transcripción basal puede definirse como la actividad inherente de los promotores y del mecanismo transcripcional in vivo en ausencia de secuencias de regulación. En las bacterias, la RNA polimerasa generalmente tiene acceso a todos los promotores y puede unirse e iniciar la transcripción con cierto nivel de eficiencia en ausencia de activadores o represores. Por el contrario, los promotores eucarióticos fuertes se encuentran generalmente inactivos in vivo en ausencia de proteínas reguladoras. Esta diferencia fundamental da lugar al menos a cinco características importantes que distinguen la regulación de la expresión génica en eucariotas de las observadas en bacterias.

Primero, el acceso a los promotores eucarióticos está restringido por la estructura de la cromatina y la activación de la transcripción está asociada con múltiples cambios en la estructura de la cromatina en la región transcrita. Segundo, a pesar de que en las células eucariotas se encuentran tanto elementos de regulación positiva como negativa, los mecanismos positivos son más predominantes. Casi todos los genes eucarióticos requieren de activación para ser transcritos. Tercero, los mecanismos de regulación que implican lncRNAs son más comunes en la regulación transcripcional eucariota. Cuarto, las células eucariotas tienen proteínas reguladoras multiméricas más grandes y complejas que las de las bacterias. Por último, la transcripción en el núcleo eucariótico está separada tanto en el espacio como en el tiempo de la traducción en el citoplasma.

La complejidad de los circuitos de regulación en las células eucariotas es extraordinaria, como se desprende de la siguiente discusión. La sección finaliza con una descripción ilustrada de uno de los circuitos más elaborado: la complicada cascada de regulación que controla el desarrollo de la mosca del vinagre.

La cromatina transcripcionalmente activa es estructuralmente diferente de la cromatina inactiva

Los efectos de la estructura cromosómica sobre la regulación génica en los eucariotas no tienen una correspondencia clara en las bacterias. En el ciclo celular de los eucariotas, los cromosomas interfásicos tienen a primera vista una apariencia dispersa y amorfa (véase la Fig. 24-23). Sin embargo, se pueden encontrar diversas formas de cromatina a lo largo de los cromosomas. En una célula eucariota típica, alrededor del 10% de la cromatina se encuentra en un estado más condensado que el resto de la cromatina. Esta forma, la **heterocromatina**, es transcripcionalmente inactiva. La heterocromatina está asociada generalmente a estructuras cromosómicas definidas, los centrómeros, por ejemplo. La cromatina restante, menos condensada, se denomina **eucromatina**.

La transcripción de un gen eucariótico está fuertemente reprimida cuando su DNA está condensado en la heterocromatina. Una parte de la eucromatina, pero no toda, es transcripcionalmente activa. Las regiones cromosómicas transcripcionalmente activas se distinguen de la heterocromatina en al menos tres aspectos: el posicionamiento de los nucleosomas, la presencia de variantes de las histonas y la modificación covalente de los nucleosomas. Estos cambios estructurales asociados a la transcripción se conocen colectivamente como **remodelación de la cromatina**. La remodelación utiliza un grupo de enzimas que facilitan estos cambios (Tabla 28-2).

Cuatro familias conocidas de complejos que remodelan la cromatina, diferenciadas por sus características estructurales, actúan directamente para alterar la composición del nucleosoma en regiones transcritas. Van a desenrollar, traslocar, eliminar o cambiar nucleosomas en el DNA, hidrolizando ATP en el proceso (Tabla 28-2, véase la nota al pie de la tabla para la descripción de las abreviaturas de los complejos enzimáticos aquí descritos). En algunos casos, las enzimas catalizan el intercambio de pares de histonas en los nucleosomas para alterar su composición. La multitud de complejos diferentes se especializan para funcionar en genes particulares o regiones cromosómicas. Existen dos complejos relacionados en la familia **SWI/SNF** en todas las células eucariotas, las cuales remodelan la cromatina de manera que los nucleosomas se espacian más irregularmente. Además estimulan la unión de factores de transcripción. Cada complejo incluye un componente denominado bromodominio cerca del extremo carboxilo-terminal de la subunidad ATPasa activa, que interacciona con las colas acetiladas de las histonas. Los dos complejos distintos funcionan generalmente en diferentes grupos de genes. La mayoría de los complejos de la familia **ISWI** optimizan el espaciado de los nucleosomas para permitir el ensamblaje de la cromatina y el silenciamiento transcripcional. Existen de 9 a 10 complejos de la familia **CHD** en células eucariotas, separadas en tres subfamilias. Los diferentes miembros de la familia tienen roles especializados, ya sea expulsando nucleosomas para activar la transcripción o ensamblar la cromatina para reprimir la transcripción. Los complejos de la familia **INO80** tienen una variedad de roles en el remodelaje de la cromatina para activar la transcripción y la reparación del DNA. Un miembro de la familia, SWR1, promueve el intercambio de subunidades en los nucleosomas para introducir variantes de histonas como H2AZ (ver Caja 24-2), encontrada en regiones transcripcionalmente activas. La acción de estos complejos no está completamente entendida, pero sabemos que son esenciales para la activación de la transcripción.

La modificación covalente de las histonas está alterada profundamente en la cromatina transcripcionalmente activa. Las histonas internas de los nucleosomas (H2A, H2B, H3 y H4; véase la Fig. 24-25) se modifican por metilación de residuos Lys o Arg, fosforilación de residuos Ser o Thr, acetilación (véase más adelante), ubiquitinación (véase la Fig. 27-49) o sumoilación. Cada una de las histonas internas posee dos dominios estructurales distintos. Un dominio central está implicado en las interacciones histona-histona y en el enrollamiento del DNA alrededor del nucleosoma. Un dominio amino-terminal rico en lisina se encuentra generalmente en el exterior del nucleosoma ensamblado; las modificaciones covalentes se producen en residuos específicos concentrados en este dominio amino-terminal. Los patrones de modificación han hecho que se proponga la existencia de un código de histonas, en el que los patrones de modificación serían reconocidos por enzimas que alteran la estructura de la cromatina. En efecto, algunas de las modificaciones son esenciales para la interacción con proteínas que juegan un papel clave en la transcripción.

La acetilación y la metilación de las histonas juegan un papel destacado en los procesos de activación de la cromatina para la trascripción. Durante la transcripción la histona H3 es metilada (por metilasas específicas de histonas) en los nucleosomas en la Lys^4 cerca del extremo 5' de la región codificante y en la Lys^{36} a lo largo de toda la región codificante. Estas metilaciones permite la unión de **histona acetiltransferasas (HAT)**, enzimas que acetilan residuos Lys específicos. Las HAT citosólicas (tipo B) acetilan histonas recién sintetizadas antes de que sean importadas por el núcleo. La unión posterior de las histonas en la cromatina está facilitado por chaperonas de histonas: CAF1 para la H3 y la H4 (véase el Recuadro 24-2) y NAP1 para la H2A y la H2B.

Allí donde la cromatina está siendo activada para la transcripción, las histonas del nucleosoma se acetilan por HAT nucleares (tipo A). La acetilación de múltiples residuos de Lys en los dominios amino-terminales de las histonas H3 y H4 puede debilitar la afinidad del nucleosoma completo hacia el DNA. La acetilación de residuos Lys específicos es crucial en las interacciones de los nucleosomas con otras proteínas. Cuando ya no es necesaria la transcripción de un gen, la acetilación extensa de los nucleosomas en la región donde se encuentra disminuye por acción de las **histona desacetilasas (HDAC)**, como parte del proceso general de silenciación de genes que restablece el estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina. Las deacetilasas incluyen SIRT1, SIRT2, SIRT6 y SIRT7, enzimas dependientes de NAD^+ en la familia de las sirtuinas (SIRT1-7 en mamíferos). Estos desacetilan residuos de Lys específicos en histonas y otros objetivos citoplasmáticos. Además de la eliminación de determinados grupos acetilo, nuevas modificaciones covalentes de las histonas marcan la cromatina como transcripcional-

Copy-Station

TABLA 28-2 Algunos complejos enzimáticos que catalizan cambios estructurales en la cromatina durante la transcripción

Complejo enzimático[a]	Estructura oligomérica (número de polipéptidos)	Origen	Actividades
Movimiento / reemplazamiento de histonas por enzimas que requieren ATP			
Familia SWI/SNF	8-17 M_r >10^6	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma; activación de la transcripción
Familia ISWI	2-4	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma; represión de la transcripción; activación de la transcripción en algunos casos
Familia CHD	1-10	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma; expulsión del nucleosoma para la activación de la transcripción
Familia INO80	>10	Eucariotas	Remodelación del nucleosoma y activación de la transcripción; el miembro de la familia SWR1 participa en el reemplazo de H2A-H2B con H2AZ-H2B
Modificación de histona			
GCN5-ADA2-ADA3	3	Levadura	GCN5 tiene la actividad HAT tipo A
SAGA/PCAF	>20	Eucariotas	Incluye GCN5-ADA2-ADA3; acetila residuos en H3 y H2B
NuA4	≥12	Eucariotas	El componente EsaI tiene actividad HAT; acetila H4, H2A y H2AZ
Chaperonas de histonas que no requieren ATP			
HIRA	1	Eucariotas	Descarga de H3.3 durante la transcripción

[a]Las abreviaturas utilizadas para identificar genes eucarióticos y proteínas son a menudo más confusas u oscuras que las utilizadas en bacterias. SWI (*swi*tching, cambio) fue descubierta como una proteína requerida para la expresión de ciertos genes involucrados en el cambio del tipo de apareamiento en levaduras, y SNF (sacarosa *no* fermentable) como un factor para la expresión del gen de levaduras para la sacarosa. Estudios posteriores descubrieron múltiples proteínas SWI y SNF que actuaban en forma de complejo. El complejo SWI/SNF desempeña un papel en la expresión de una amplia gama de genes y se ha encontrado en muchos eucariotas, incluidos los humanos. ISWI es *i*mitación SWI. CHD es *c*romodominio, *h*elicasa, de unión a *D*NA; INO80, requerimiento de *ino*sitol *80*; y SWR1, ATPasa *r*elacionada con *SWI2*/Snf2. El complejo formado por GCN5 (control *g*eneral *n*o desreprimible) y las proteínas ADA (*a*lteración/*d*eficiencia *a*ctivación) fue descubierto durante la investigación de la regulación de los genes del metabolismo del nitrógeno en levaduras. Estas proteínas pueden ser parte del complejo SAGA mayor (*SP*F, *ADA2,3, GCN5, a*cetiltransferasa) de levaduras. El equivalente de SAGA en humanos es PCAF (*p300/factor a*sociado a CBP). NuA4 es la acetiltransferasa de la H4 nucleosomal; ESA1 es una acetiltransferasa esencial relacionada con SAS2. HIRA es el regulador A de histonas.

mente inactiva. A modo de ejemplo, el residuo Lys^9 de la histona H3 se encuentra a menudo metilado en la heterocromatina.

El efecto final de la remodelación de la cromatina en el contexto de la transcripción consiste en producir un segmento del cromosoma más accesible y en "marcarlo" (modificar químicamente) para facilitar la unión y la actividad de los factores de transcripción que regulan la expresión del gen o genes que allí se encuentran.

La mayoría de promotores eucarióticos se regula positivamente

Como se ha indicado anteriormente, las RNA polimerasas eucarióticas tienen poca o ninguna afinidad intrínseca por sus promotores; el inicio de la transcripción es casi siempre dependiente de la acción de múltiples proteínas activadoras. Una razón de peso del aparente predominio de la regulación positiva parece obvia: el empaquetamiento del DNA en la cromatina hace inaccesibles a la mayoría de promotores; por tanto, los genes normalmente permanecen silenciosos en ausencia de regulación de otro tipo. La estructura de la cromatina afecta el acceso a algunos promotores más que a otros, pero la presencia de represores que se unen al DNA para imposibilitar el acceso de la RNA polimerasa (regulación negativa) sería a menudo simplemente redundante. Otros factores pueden favorecer la utilización de la regulación positiva; dos de ellos se consideran de forma especulativa como los más importantes: el gran tamaño de los genomas eucarióticos y la mayor eficiencia de la regulación positiva.

Primero, la unión no específica de proteínas reguladoras al DNA se convierte en un problema más importante en los grandes genomas de los eucariotas superiores, pues la posibilidad de que una determinada secuencia de unión específica se encuentre al azar en un sitio inapropiado también aumenta con el tamaño del genoma. El control combinatorio se vuelve importante en un genoma de gran tamaño **(Fig. 28-28)**. Se puede mejorar la especificidad de la activación de la transcripción si diversas proteínas reguladoras positivas se tienen que unir a secuencias específicas de DNA para activar un gen. El número promedio de sitios de regulación de los genes de un organismo multicelular es de seis. El requisito que múltiples proteínas reguladoras positivas tengan que unirse a secuencias específicas de DNA reduce enormemente la probabilidad de que se produzca al azar la yuxtaposición funcional de todos los sitios de unión necesarios. Además, el número de proteínas reguladoras que deben ser codificadas por un genoma para regular todos sus genes puede ser menor (Fig. 28-28).

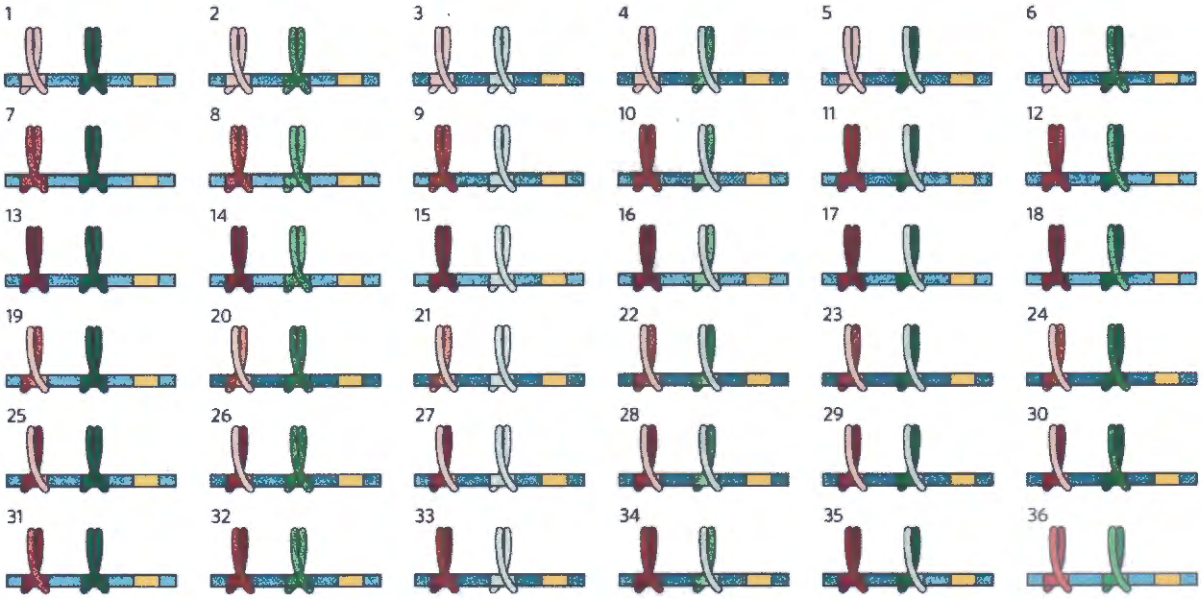


FIGURA 28-28 Ventajas del control combinatorio. El control combinatorio permite la regulación específica de muchos genes usando un repertorio limitado de proteínas reguladoras. Considérense las posibilidades de regulación inherentes con dos familias diferentes de proteínas de cremallera de leucina (rojo y verde). Si cada familia de proteínas reguladoras génicas posee tres miembros (mostrados aquí en tonos oscuro, mediano y claro, cada uno unido a una secuencia de DNA diferente) que pueden formar libremente tanto homo- como heterodímeros, hay seis especies diméricas posibles en cada familia, cada una de las cuales reconocería un secuencia reguladora bipartita de DNA diferente. Si un gen tuviera un sitio regulador para cada familia de proteínas, serían posibles 36 combinaciones reguladoras, utilizando solamente las seis proteínas de las dos familias. Con seis o más sitios usados en la regulación de un gen eucariótico típico, el número de posibles variantes es mucho mayor que el mostrado en este ejemplo.

Copy Station

Por lo tanto, no se necesita un nuevo regulador para cada gen; a pesar de todo, la regulación es suficientemente compleja en los eucariotas superiores como para que las proteínas reguladoras representen del 5% al 10% de todos los genes que codifican proteínas. En principio, se podría utilizar una estrategia combinatoria similar con múltiples elementos de regulación negativa, pero esta consideración nos remite a la segunda razón para la utilización de la regulación positiva: es sencillamente más eficiente. Si los ~20.000 genes del genoma humano se regulasen negativamente, cada célula debería sintetizar en todo momento el mismo número de represores diferentes en concentraciones suficientes que permitiesen la unión específica a cada uno de los genes "no deseados". En la regulación positiva, la mayoría de los genes están normalmente inactivos (es decir, las RNA polimerasas no se unen a los promotores) y las células tienen que sintetizar solamente las proteínas activadoras necesarias para promover la transcripción del subconjunto de genes necesarios para esa célula en un determinado momento. A pesar de estos argumentos, tal como veremos, hay ejemplos de regulación negativa en los eucariotas, desde las levaduras hasta los humanos. Algunas de estas regulaciones negativas incluyen lncRNAs, los cuales son más económicos de sintetizar que los represores proteicos.

Los activadores y coactivadores de unión al DNA facilitan el ensamblaje de los factores de transcripción generales

Para continuar nuestra exploración de la regulación de la expresión génica en los eucariotas, volveremos a examinar las interacciones entre los promotores y la RNA polimerasa II (Pol II), el enzima responsable de la síntesis de los mRNA eucarióticos. Aunque la mayoría de promotores (aunque no todos) de la Pol II incluyen la caja TATA y las secuencias Inr (iniciador) con sus espaciados estándar (véase la Fig. 26-8), éstos varían mucho en número y en la localización de secuencias adicionales necesarias para la regulación de la transcripción.

Las secuencias reguladoras adicionales, unidas generalmente por activadores de la transcripción, se denominan a menudo **potenciadores** en los eucariotas superiores y **secuencias activadoras corriente arriba (UAS)** en levaduras. Un potenciador típico se puede encontrar a centenares o incluso a miles de pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, incluso puede encontrarse más abajo, dentro del propio gen. Cuando está unido a las proteínas reguladoras apropiadas, un potenciador aumenta la transcripción de los promotores cercanos, independientemente de su orientación en el DNA. Las UAS de las levaduras funcionan de manera similar, aunque generalmente tienen que estar situados corriente arriba y a no más de unos pocos centenares de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

La unión eficaz del holoenzima de la RNA polimerasa II a uno de sus promotores necesita normalmente la acción combinada de proteínas de cinco tipos distintos: (1) **activadores de la transcripción**, que se unen a los potenciadores o a UAS y facilitan la transcripción; (2) **regnladores arquitectónicos**, que facilitan la formación de lazos en el DNA; (3) **proteínas de modificación y remodelación de la cromatina**, descritas anteriormente; (4) **coactivadores**; y (5) **factores de transcripción basal**, también conocidos como facto-

res de transcripción general (véase la Fig. 26-9, Tabla 26-2), necesarios en la mayoría de promotores de Pol II **(Fig. 28-29)**. Los coactivadores son necesarios para la comunicación esencial entre los activadores y el complejo formado por la Pol II y los factores de transcripción basales. Los coactivadores también juegan un rol directo en el ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC). Además, diversas proteínas represoras pueden interferir en la comunicación entre la RNA polimerasa y los activadores, con el resultado de la represión de la transcripción (Fig. 28-29b). A continuación nos centraremos en los complejos proteicos que se muestran en la Figura 28-29 y en cómo interaccionan para activar la transcripción.

Activadores de la transcripción Los requerimientos de activadores varían mucho de un promotor a otro. Se conocen algunos activadores que facilitan la transcripción de centenares de promotores, mientras que otros son específicos de unos pocos promotores. Muchos activadores son sensibles a la unión de moléculas señal, que proporcionan la capacidad de activar o desactivar la transcripción en respuesta a un cambio en el ambiente celular. Algunos potenciadores con los que se asocian los activadores están bastante distantes de la secuencia TATA del promotor. Una multiplicidad de potenciadores (a menudo seis o más) interaccionan con un número similar de activadores en un gen típico, lo que hace posible el control combinatorio y la respuesta a múltiples señales.

Algunos activadores transcripcionales se pueden unir tanto a DNA como a RNA, y su función es alentada por uno o más lncRNAs. La proteína NF-κB, por ejemplo, activa la transcripción de varios genes involucrados en la respuesta inmune y la producción de citosinas. Puede unirse a una secuencia potenciadora del DNA o, alternativamente, a un lncRNA llamado *lethe* (Fig. 28-14; llamado así por el río del olvido en la mitología Griega). El lncRNA reduce la transcripción de los genes controlados por NF-κB.

Reguladores arquitectónicos ¿Cómo funcionan a distancia los activadores? La respuesta en la mayoría de casos parece ser que, como se ha indicado anteriormente, el

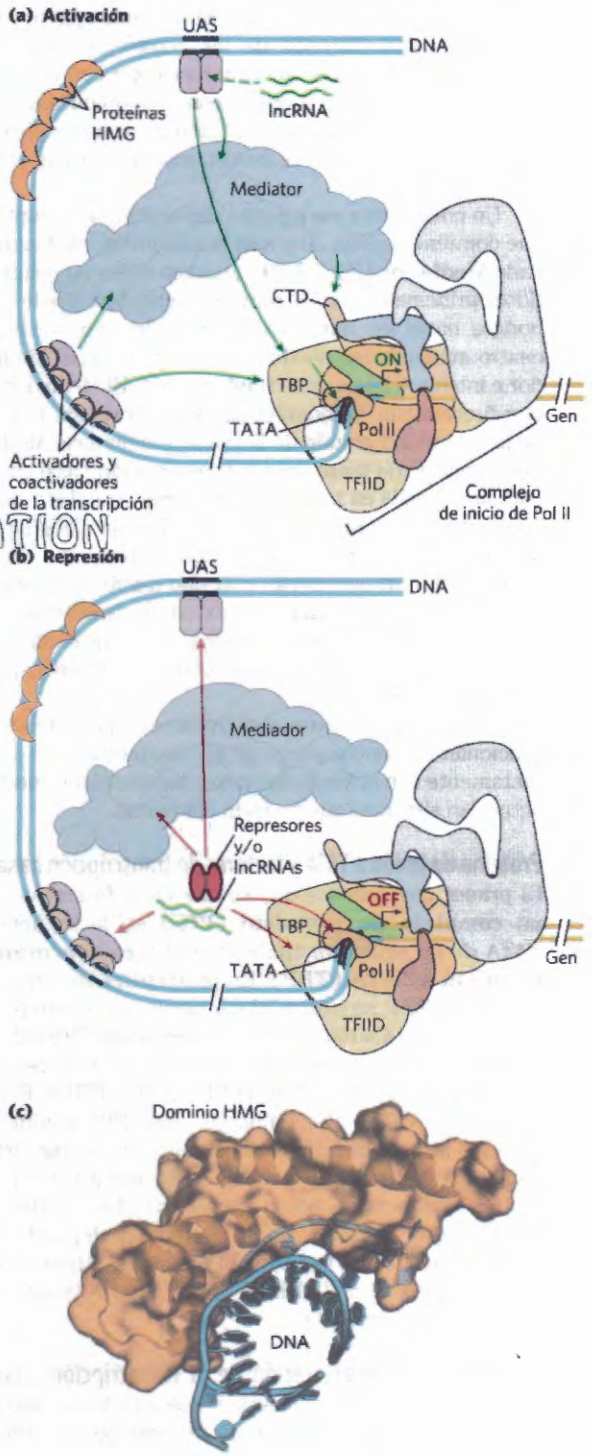


FIGURA 28-29 Promotores eucarióticos y proteínas reguladoras. La RNA polimerasa II y sus factores de transcripción generales asociados forman un complejo de preinicio en la secuencia TATA y en el sitio Inr de los promotores afines, un proceso facilitado por activadores de la transcripción que actúan a través de coactivadores (Mediador, TFIID o ambos). **(a)** Promotor compuesto con elementos de secuencia típicos y complejos proteicos, que se han encontrado tanto en levaduras como en eucariotas superiores. El dominio carboxilo-terminal (CTD) de Pol II (véase la Fig. 26-9) es un punto de interacción importante con el Mediador y otros complejos proteicos. Enzimas de modificación de las histonas (no mostrados) catalizan la metilación y la acetilación; los enzimas de remodelación alteran el contenido y la posición de los nucleosomas. Los dominios de unión al DNA y de activación de lo activadores de la transcripción son distintos. Las flechas verdes indican las modalidades comunes de interacción requeridas frecuentemente para la activación de la transcripción, tal como se discute en el texto. Las proteínas HMG son un tipo común de regulador arquitectónico (véase la Fig. 28-5) que favorece la formación del lazo en el DNA, necesario para aproximar componentes del sistema unidos a sitios distantes. **(b)** Los represores de la transcripción eucarióticos funcionan a través de mecanismos diversos. Algunos se unen directamente al DNA, desplazando un complejo proteico necesario para la activación (no mostrado); otros muchos interaccionan con varias partes de los complejos proteicos de transcripción o de activación para impedir la activación. Las flechas rojas indican los posibles puntos de interacción. **(c)** La estructura de un complejo de una proteína HMG unida al DNA muestra la forma en la que las proteínas HMG facilitan la formación del lazo. La unión es relativamente inespecífica, aunque se han encontrado preferencias de unión hacia secuencias de DNA para muchas proteínas HMG. Se muestra el dominio HMG de la proteína HMG-D de *Drosophila* unido al DNA [Fuente: **(c)** PDB ID 1QRV, F. V. Murphy IV et al., *EMBO J.* 18:6610, 1999.]

COPYSTATION

DNA interpuesto forma un lazo, de manera que varios complejos proteicos pueden interaccionar directamente. La formación del lazo está facilitada por reguladores arquitectónicos que son abundantes en la cromatina y que se unen al DNA con especificidad limitada. De manera muy especial, las proteínas del **grupo de alta movilidad (HMG)** (Fig. 28-29c; "alta movilidad" se refiere a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida) desempeñan un papel estructural importante en el remodelado de la cromatina y en la activación de la transcripción.

Complejos proteicos coactivadores La transcripción requiere casi siempre la presencia de complejos proteicos adicionales. Algunos de los complejos proteicos reguladores principales que interaccionan con la Pol II se han definido tanto genética como bioquímicamente. Estos complejos coactivadores actúan como intermedios entre los activadores de la transcripción y el complejo Pol II.

Un coactivador eucariótico destacado, un complejo que contiene de 20 a 30 o más polipéptidos, es denominado **Mediador** (Fig. 28-29). Muchos de los 20 polipéptidos principales están muy conservados desde los hongos hasta los humanos. Un complejo adicional de cuatro subunidades puede interaccionar con el Mediador e inhibir el inicio de la transcripción. El Mediador se une fuertemente al dominio carboxilo-terminal (CTD) de la subunidad grande de la Pol II. El complejo Mediador es necesario tanto para la transcripción basal como para la regulada en muchos promotores de Pol II y también estimula la fosforilación del CTD por TFIIH (un factor de transcripción basal). Los activadores de la transcripción interaccionan con uno a más componentes del complejo Mediador. Los sitios de interacción precisos difieren de un activador a otro. Los complejos coactivadores funcionan en o cerca de la secuencia TATA del promotor.

Se han descrito otros coactivadores adicionales que funcionan con uno o pocos genes. Algunos actúan conjuntamente con el Mediador, mientras que otros pueden actuar en sistemas que no usan Mediador.

Proteína de unión a TATA y factores de transcripción basal El primer componente que se une en la formación de un **complejo de preinicio (PIC)** en la secuencia TATA de un promotor típico de Pol II es la **proteína de unión a TATA (TBP)**. En promotores sin secuencia TATA, TBP se utiliza como parte de un complejo mayor (13 a 14 subunidades) denominado TTFIID. El complejo completo también incluye los factores de transcripción basal TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH; Pol II y, tal vez, TFIIA. Sin embargo, este PIC mínimo a menudo no es suficiente para el inicio de la transcripción y generalmente no se forma en absoluto si el promotor está ocluido en la cromatina. La regulación positiva que estimula la transcripción depende de activadores y coactivadores. El Mediador interacciona directamente con TFIIH y TFIIE, permitiendo su reclutamiento en el PIC.

Coreografía de la activación de la transcripción Ahora podemos empezar a ordenar la secuencia de sucesos de la activación transcripcional en un promotor de Pol II típico **(Fig. 28-30)**. El orden exacto de la unión de algunos componentes puede variar, pero el modelo de la Figura 28-30 ilustra los principios de la activación así como una ruta común. Muchos activadores de la transcripción tienen una afinidad significativa por sus sitios de unión, incluso si estos sitios se encuentran en el interior de cromatina condensada. La unión de activadores a menudo desencadena la activación del promotor. La unión de un activador puede permitir la unión de otros, que puede acabar en el desplazamiento gradual de algunos nucleosomas.

La remodelación obligada de la cromatina se lleva a cabo por etapas, facilitadas por interacciones entre activadores y HAT o complejos enzimáticos tales como SWI/SNF (o ambos). De esta manera, un activador unido puede atraer a otros componentes necesarios para una más profunda remodelación de la cromatina que permita la transcripción de genes específicos. Los activadores unidos interaccionan con el gran complejo Mediador. El Mediador, a su vez, suministra una superficie de formación para la unión primero de TBP (o TFIID), después de TFIIB y finalmente de otros componentes del PIC, incluida la Pol II. El Mediador estabiliza la unión de la Pol II y sus factores de transcripción asociados y facilita mucho la formación del PIC. La complejidad en estos circuitos de regulación es una norma más que una excepción, con múltiples activadores unidos al DNA que promueven la transcripción.

El guión puede cambiar de un promotor a otro. Por ejemplo, muchos promotores tienen un conjunto diferente de secuencias de reconocimiento y pueden carecer de secuencia TATA, y en eucariotas multicelulares la composición en subunidades de los factores tales como TFIID puede variar de un tejido a otro. No obstante, la mayoría de promotores parecen requerir un ensamblaje ordenado de los componentes para iniciar la transcripción. El proceso de montaje no siempre es rápido. En algunos genes puede durar minutos, en otros genes de los eucariotas superiores puede durar días.

Activación transcripcional reversible Aunque no es frecuente, algunas proteínas reguladoras eucarióticas que se unen a los promotores de la Pol II o que interaccionan con activadores transcripcionales pueden actuar como represores, inhibiendo la formación de PIC activos (Fig. 28-30). Algunos activadores pueden adoptar múltiples conformaciones, que los capacitan para actuar como activadores o represores transcripcionales. Por ejemplo, algunos receptores de hormonas esteroides (descritos más adelante) funcionan en el núcleo como activadores de la transcripción, estimulando la transcripción de ciertos genes cuando está presente una señal hormonal esteroidea determinada. Cuando la hormona está ausente, las proteínas receptoras revierten a una conformación que actúa de represor, *impidiendo* la formación de los PIC. En algunos casos, esta represión implica la interacción con histona desacetilasas y otras proteínas que ayudan a restablecer el estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina circundante. El Mediador, cuando incluye las subunidades inhibidoras, también puede bloquear el inicio de la transcripción. Este mecanismo regulador puede asegurar la formación ordenada de los PIC (demorando la activación de la transcripción hasta que

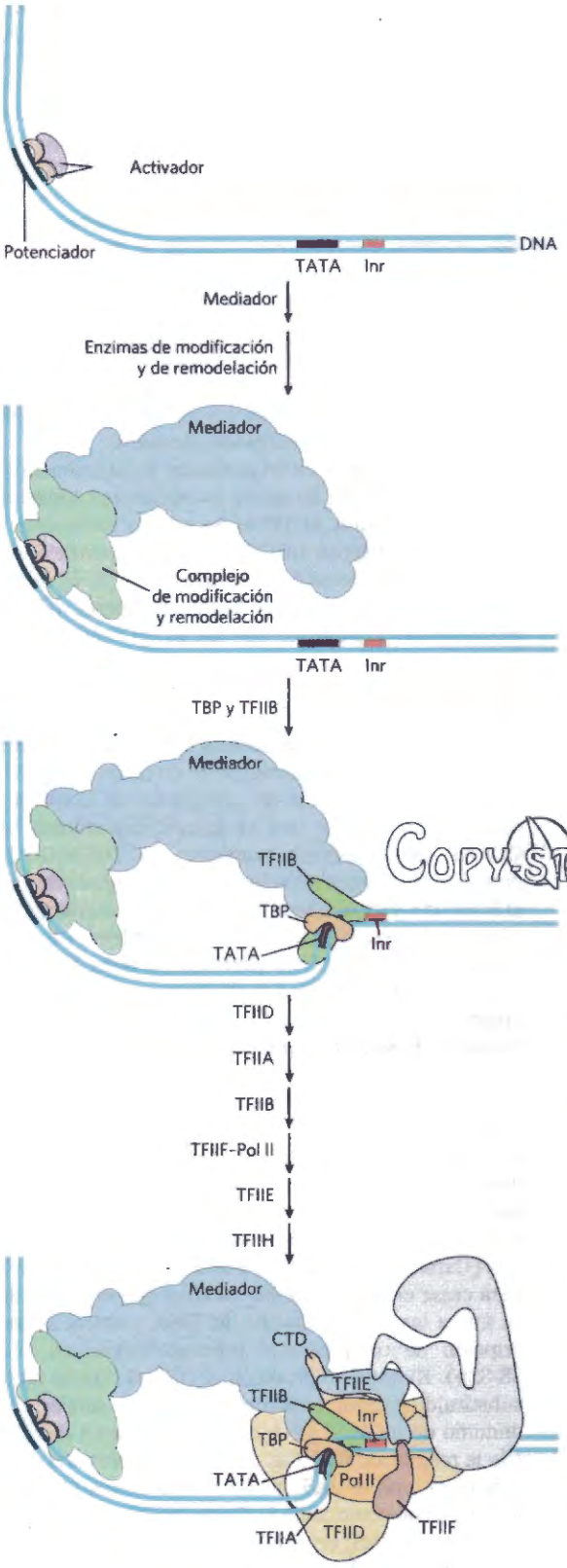


FIGURA 28-30 Componentes de la activación transcripcional. En primer lugar los activadores se unen al DNA. Los activadores reclutan los complejos de modificación de las histonas y de remodelación de los nucleosomas y un coactivador tal como el Mediador. El Mediador facilita la unión de TBP (o TFIID) y TFIIB y a continuación se unen los restantes factores de transcripción basales y la Pol II. La fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la Pol II provoca el inicio de la transcripción (no mostrado). [Fuente: Información de J. A. D'Alessio et al., *Mol Cell* 36:924, 2009.]

todos los factores requeridos estén presentes) o puede ser un mecanismo que ayude a desactivar los promotores una vez que la transcripción ya no sea necesaria.

Los genes del metabolismo de la galactosa en levaduras están sujetos a la vez a regulación positiva y negativa

Algunos de los principios generales descritos anteriormente se pueden ilustrar mediante un circuito regulador eucariótico muy bien estudiado **(Fig. 28-31)**. Los enzimas necesarios para la importación y el metabolismo de la galactosa en levaduras están codificados en genes dispersos en varios cromosomas (Tabla 28-3). Cada uno de los genes *GAL* se transcribe separadamente y las células de levadura no tienen operones como los de las bacterias. Sin embargo, todos los genes *GAL* tienen promotores similares y están regulados de forma coordinada por un conjunto común de proteínas. Los promotores para los genes *GAL* consisten en la secuencia TATA y las secuencias Inr, así como una secuencia activadora en el lado 5' (UAS_G) reconocida por la proteína activadora de la transcripción Gal4 (Gal4p). La regulación de la expresión génica por la galactosa implica una interacción entre Gal4p y otras dos proteínas, Gal80p y Gal3p (Fig. 28-31). Gal80p forma un complejo con Gal4p, que impide que Gal4p funcione como un activador de los promotores *GAL*. Cuando la galactosa está presente, se une a Gal3p, que entonces interacciona con el complejo Gal80p-Gal4p, permitiendo que Gal4p funcione como un activador en los diferentes promotores *GAL*. A medida que se inducen los diversos genes galactosa y se acumulan sus productos, Gal3p puede ser sustituido por Gal1p (una galactoquinasa necesaria en el metabolismo de la galactosa que también funciona como un regulador) para la activación sostenida del circuito regulador.

Otros complejos proteicos también desempeñan un papel en la activación de la transcripción de los genes *GAL*. Entre ellos, se encuentran el complejo SAGA para la acetilación de histonas, el complejo SWI/SNF para la remodelación de la cromatina y el Mediador. La proteína Gal4 es responsable del reclutamiento de estos factores adicionales, necesarios para la activación transcripcional. SAGA puede ser la primera y principal diana reclutada por Gal4p.

La glucosa es la fuente de carbono preferida por las levaduras, al igual que por las bacterias. Cuando la glucosa está presente, la mayoría de los genes *GAL* están reprimidos, tanto si la galactosa está presente como si no. El sistema regulador de *GAL* descrito anteriormente es anulado eficazmente por un complejo sistema de represión por catabolito que consta de varias proteínas (no representado en la Figura 28-30).

Los activadores de la transcripción tienen estructura modular

Los activadores de la transcripción tienen normalmente un dominio estructural distinto para la unión específica al DNA y uno o más dominios adicionales para la activa-

COPY-STATION

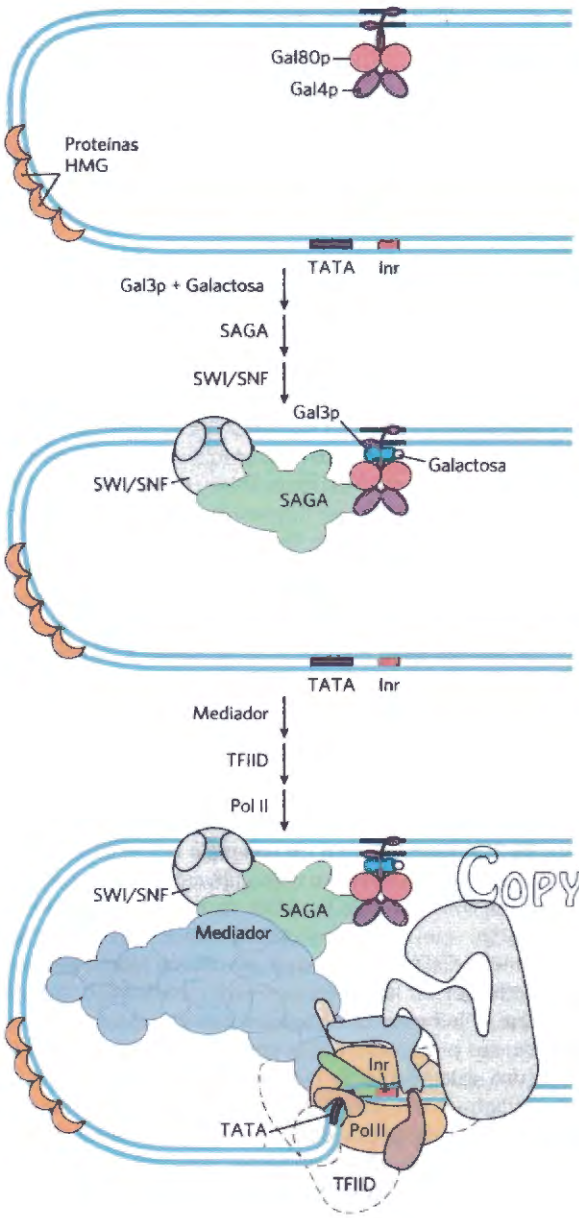


FIGURA 28-31 Regulación de la transcripción de genes *GAL* en levaduras. La galactosa importada al interior de la célula se convierte en galactosa-6-fosfato por una ruta que consta de seis enzimas, cuyos genes están distribuidos en tres cromosomas (véase la Tabla 28-3). La transcripción de estos genes se regula por la acción combinada de las proteínas Gal4p, Gal80p, y Gal3p, con Gal4p desempeñando el papel central como activador de la transcripción. El complejo Gal4p/Gal80p es inactivo. La unión de la galactosa a Gal3p comporta la interacción de Gal3p con el complejo Gal80p-Gal4p con lo que se activa Gal4p. produce un cambio conformacional en Gal80p. A continuación Gal4p reclute el Mediador SAGA y TFIID a los promotores de galactosa lo que lleva a reclutar la RNA polimerasa II y al inicio de la transcripción.

ción de la transcripción o para la interacción con otras proteínas reguladoras. La interacción de dos proteínas reguladoras está facilitada a menudo por dominios que contienen cremalleras de leucina (Fig. 28-15) o motivos hélice-lazo-hélice (Fig. 28-16). Aquí consideraremos tres tipos distintos de dominios estructurales utilizados en la activación por activadores de la transcripción Gal4p, Sp1 y CTF1 **(Fig. 28-32a)**.

Gal4p contiene una estructura parecida a un dedo de zinc en su dominio de unión al DNA, cerca del extremo amino; este dominio tiene seis residuos Cys que coordinan dos Zn^{2+}. La proteína funciona como un homodímero (con la dimerización debida a las interacciones entre dos hélices espiraladas) y se une a UAS_G, una secuencia de DNA palindrómica de unos 17 pb de longitud. Gal4p tiene un dominio de activación independiente con muchos residuos aminoácidos acídicos. Los experimentos en que el **dominio de activación acídico** de Gal4p se ha sustituido por una variedad de secuencias peptídicas diferentes sugieren que la naturaleza acídica de este domino es determinante para su función, a pesar de que su secuencia de aminoácidos concreta puede variar considerablemente.

Sp1 (M_r 80.000) es un activador de la transcripción de un gran número de genes en eucariotas superiores. Su sitio de unión al DNA, la caja o secuencia GC (secuencia consenso GGGCGG), se encuentra normalmente bastante cerca de la secuencia TATA. El dominio de unión al DNA de la proteína Sp1 está cerca del extremo carboxilo y contiene tres dedos de zinc. Otros dos dominios de Sp1 funcionan en la activación; es destacable que el 25% de sus residuos aminoácidos sean Gln. Una amplia variedad de otras proteínas activadoras poseen también estos **dominios ricos en glutamina**.

CTF1 (*f*actor de *t*ranscripción de unión a *C*CAAT *1*) pertenece a una familia de activadores de la transcripción que se unen a una secuencia denominada sitio CCAAT (su secuencia consenso es $TGGN_6GCCAA$, donde N es cualquier nucleótido). El dominio de unión al DNA de CTF1 contiene muchos residuos aminoácidos básicos y la región de unión está probablemente estructurada en hélice α. Esta proteína no tiene ni motivos hélice-giro-hélice ni dedos de zinc; su mecanismo de unión al DNA todavía no se ha aclarado. CTF1 tiene un **dominio de activación rico en prolina**, en el que Pro representa más del 20% de los residuos aminoácidos.

Los dominios de activación discretos y los de unión al DNA de las proteínas reguladoras a menudo actúan de forma completamente independiente, tal como se ha demostrado en experimentos de "intercambio de dominios". El dominio de activación rico en prolina de CTF1 puede fusionarse mediante técnicas de ingeniería genética (Capítulo 9) con el dominio de unión al DNA de Sp1 para crear una proteína que, al igual que el Sp1 intacto, se une a las secuencias GC del DNA y activa la transcripción de un promotor cercano (como en la Fig 28-32b). El dominio de unión al DNA de Gal4p ha sido substituido experimentalmente de forma similar con el dominio de unión al DNA del represor LexA de *E. coli* (de la respuesta SOS; Fig. 28-21). Esta proteína quimérica ni se une a UAS_G ni activa los genes *GAL* de la levadura (tal como haría la Gal4p intacta), a menos que la secuencia UAS_G en el DNA se sustituya por el sitio de reconocimiento de LexA.

La expresión génica eucariótica puede ser regulada por señales intercelulares e intracelulares

Los efectos de las hormonas esteroideas (y de las hormonas tiroideas y retinoides, que comparten un modo

TABLA 28-3 Genes del metabolismo de la galactosa en levaduras

Gen	Función proteica	Localización cromosómica	Tamaño de la proteína (número de residuos)	Expresión proteica relativa en diferentes fuentes de carbono		
				Glucosa	Glicerol	Galactosa
Genes regulados						
GAL1	Galactoquinasa	II	528	–	–	+++
GAL2	Galactosa permeasa	XII	574	–	–	+++
PGM2	Fosfoglucomutasa	XIII	569	+	+	++
GAL7	Galactosa 1-fosfato uridililtransferasa	II	365	–	–	+++
GAL10	UDP-glucosa 4-epimerasa	II	699	–	–	+++
MEL1	α-Galactosidasa	II	453	–	+	++
Genes reguladores						
GAL3	Inductor	IV	520	–	+	++
GAL4	Activador de la transcripción	XVI	881	+/–	+	+
GAL80	Inhibidor de la transcripción	XIII	435	+	+	++

Fuente: Adaptado de Reece, R. & Platt, A. (1997) Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast. *Bioessays* 19, 1001-1010.

de acción similar) son ejemplos adicionales muy bien estudiados de la modulación de las proteínas reguladoras eucarióticas mediante la interacción directa con señales moleculares (véase la Fig. 12-30). A diferencia de otros tipos de hormonas, las hormonas de tipo esteroidea no se unen a receptores de la membrana plasmática. En cambio, interaccionan con receptores intracelulares que son en sí mismos activadores de la transcripción. Las hormonas esteroideas, demasiado hidrofóbicas para disolverse fácilmente en la sangre (estrógenos, progesterona y cortisol, por ejemplo), viajan unidas a proteínas transportadoras específicas desde el punto de su liberación hasta sus tejidos diana. En el tejido diana la hormona pasa a través de la membrana plasmática por difusión simple. Una vez dentro de la célula, la hormona se une a uno de los dos tipos de receptores nucleares de unión de esteroides **(Fig. 28-33)**. En ambos casos, el complejo hormona-receptor actúa mediante la unión a secuencias de DNA muy específicas denominadas **elementos de respuesta hormonal (HRE)**, alterando de este modo la expresión génica. En su acción en estos sitios, los receptores actúan como activadores de la transcripción reclutando coactivadores y la Pol II (más los factores de transcripción asociados) para iniciar la transcripción del gen.

Las secuencias de DNA (HRE) a las que se unen los complejos hormona-receptor de las diversas hormonas esteroideas son similares en longitud y estructura, pero diferentes en secuencia. Cada receptor tiene una secuencia HRE consenso (Tabla 28-4) a la que el complejo hormona-receptor se une bien. Cada secuencia consenso consiste en dos secuencias de seis nucleótidos, contiguas o separadas por tres nucleótidos, en tándem o dispuestas en palíndromo. Los receptores hormonales tienen un dominio de unión al DNA muy conservado con dos dedos de zinc **(Fig. 28-34)**. El complejo hormona-receptor se une al DNA como un

COPYSTATION

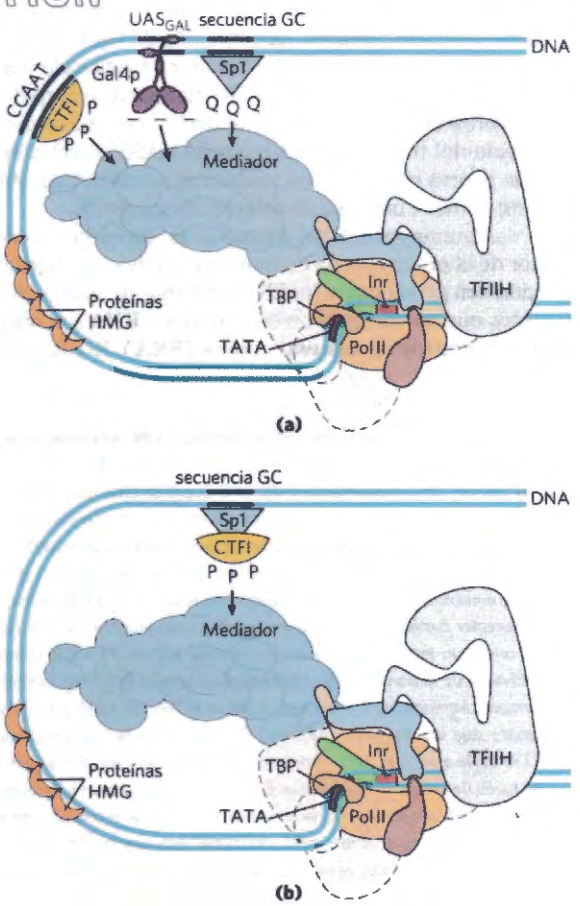


FIGURA 28-32 Activadores de la transcripción. (a) Activadores típicos tales como CTF1, Gal4p, y Sp1 tienen un dominio de unión al DNA y un dominio de activación. La naturaleza del dominio de activación se indica mediante símbolos: – – –, acídico; QQQ, rico en glutamina; PPP rico en prolina. Estas proteínas, generalmente activan la transcripción mediante la interacción con complejos coactivadores, tales como el Mediador. Obsérvese que los sitios de unión que aquí se ilustran generalmente no se encuentran juntos cerca de un único gen. **(b)** Una proteína quimérica que contiene el dominio de unión al DNA de Sp1 y el dominio de activación de CTF1 activa la transcripción si está presente una secuencia GC.

dímero y los dominios con dedos de zinc de cada monómero reconocen una de las secuencias de seis nucleótidos. La capacidad de una hormona determinada para alterar la expresión de un gen específico a través del complejo hormona-receptor depende de la secuencia exacta del HRE, su posición respecto al gen y el número de HRE asociados con el gen.

La región de unión al ligando de la proteína receptora, siempre en el extremo carboxilo, es bastante específica de cada receptor. Por ejemplo, en la región de unión al ligando, el receptor de los glucocorticoides tiene una similitud de sólo el 30% con el receptor de estrógenos y del 17% con el receptor de la hormona tiroidea. El tamaño de la región de unión al ligando varía enormemente; en el receptor de la vitamina D sólo tiene 25 residuos aminoácidos, mientras que en el receptor de los mineralocorticoides tiene 603 residuos. Las mutaciones que cambian un residuo aminoácido en estas regiones pueden provocar la pérdida de respuesta a una hormona determinada. Algunos humanos, incapaces de responder al cortisol, a la testosterona, a la vitamina D o a la tiroxina, tienen mutaciones de este tipo.

Los lncRNAs introducen una nueva dimensión en la regulación por receptores de hormonas. Un lncRNA denominado GAS5 (detención del crecimiento específico 5) inhibe la activación transcripcional por el receptor de glucocorticoides compitiendo directamente con el DNA para la unión del receptor. GAS5 también inhibe la actividad de los receptores de andrógenos, progesterona y mineralocorticoides estrechamente relacionados. Además, GAS5 interacciona con y secuestra un miRNA llamado miR-21, que interacciona con e inhibe la actividad de algunas proteínas reguladoras que actúan como supresores de tumores. La expresión de GAS5 se suprime en un gran rango de tumores, resultando en el aumento de la expresión de hormona esteroideas, mayores niveles de miR-21 activo, y crecimiento más rápido del tumor. Niveles bajos de GAS5 correlacionan con peores resultados en pacientes de cáncer, haciendo este lncRNA un tema de intensa investigación.

Algunos receptores hormonales, incluido el receptor de la progesterona en humanos, activan la transcripción con ayuda de un lncRNA diferente de ~700 nucleótidos que actúa como un coactivador - **RNA activador del receptor de los esteroides (SRA)**. El SRA forma parte de un complejo ribonucleoproteico, pero es el componente de RNA el responsable de la coactivación transcripcional. El conjunto detallado de interacciones entre el SRA y otros componentes de los sistemas reguladores de estos genes está todavía por descubrir.

La fosforilación de los factores de transcripción nucleares puede contribuir a su regulación

Vimos en el Capítulo 12 que los efectos de la insulina sobre la expresión génica se deben a una serie de pasos

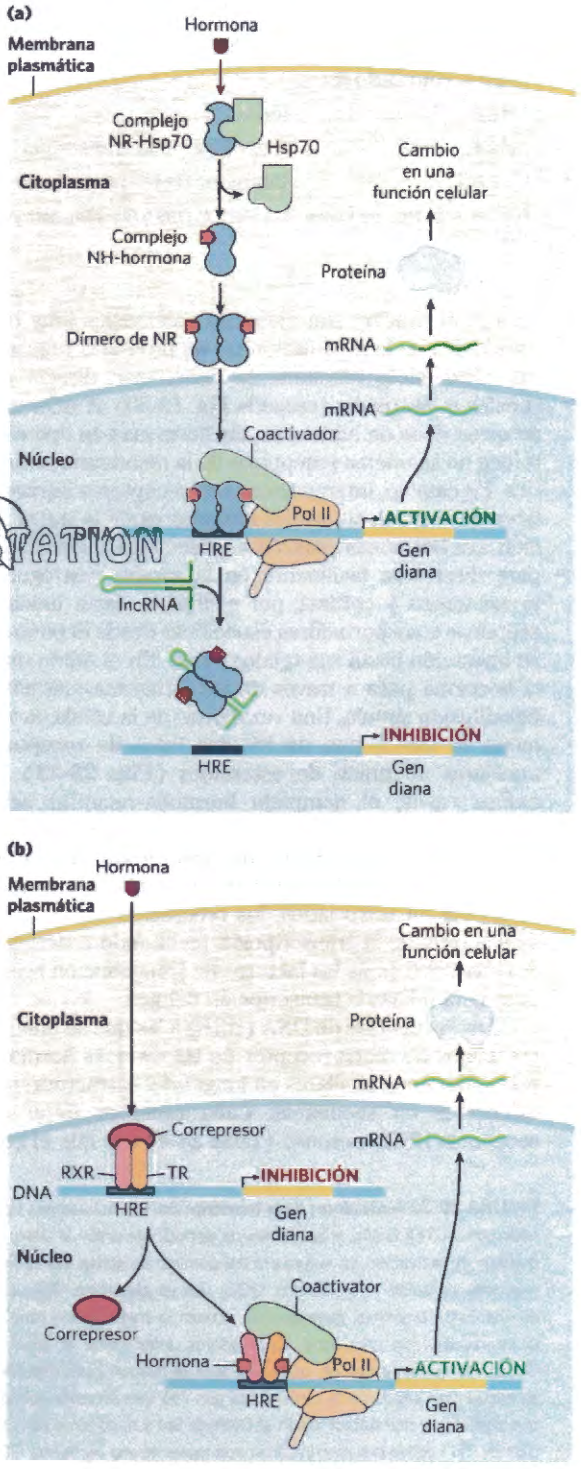


FIGURA 28-33 Mecanismos de los receptores de las hormonas esteroides. Hay dos tipos de receptores nucleares de unión de esteroides. **(a)** Los de Tipo I monomérico (NR) se encuentran en el citoplasma, formando un complejo con una proteína del choque térmico (Hsp70). Los receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos y glucocorticoides son de este tipo. Cuando se une la hormona esteroide, la Hsp70 se disocia y el receptor dimeriza, exponiendo una señal de localización nuclear. El receptor dimérico, con la hormona unida, migra hasta el núcleo donde se une a un elemento de respuesta hormonal (HRE) y actúa como un activador de la transcripción. **(b)** Los receptores de tipo II, en cambio, se encuentran siempre en el núcleo, unidos a un HRE del DNA y a un correpresor que los mantiene inactivos. El receptor de la hormona tiroidea (TR) es de este tipo. La hormona migra a través del citoplasma y difunde a través de la membrana nuclear. En el núcleo se une a un heterodímero formado por el receptor de la hormona tiroidea y el receptor X de retinoides (RXR). Un cambio conformacional provoca la disociación del correpresor y entonces el receptor actúa como un activador de la transcripción.

TABLA 28-4 Elementos de respuesta hormonal (HRE) unidos por receptores hormonales de tipo esteroide

Receptor	Secuencia consenso unida[a]
Andrógeno	GG(A/T)ACAN$_2$TGTTCT
Glucocorticoide	GGTACAN$_3$TGTTCT
Ácido retinoico (alguno)	AGGTCAN$_5$AGGTCA
Vitamina D	AGGTCAN$_3$AGGTCA
Hormona tiroidea	AGGTCAN$_3$AGGTCA
RX[b]	AGGTCANAGGTCANAG GTCANAGGTCA

[a]N representa cualquier nucleótido.

[b]Forma un dímero con el receptor del ácido retinoico o con el receptor de la vitamina D.

que desembocan finalmente en la activación de una proteína quinasa en el núcleo, que fosforila proteínas de unión al DNA específicas, cuya capacidad para actuar como factores de transcripción resulta modificada (véase la Fig. 12-19). Este mecanismo general es el responsable de los efectos de muchas hormonas no esteroideas. Por ejemplo, la vía β-adregénica, que produce niveles altos de cAMP citosólico, el cual actúa como un segundo mensajero tanto en eucariotas como en bacterias (véase la Fig. 28-18), también afecta la transcripción de una serie de genes, cada uno de los cuales se encuentra cerca de una secuencia específica de DNA denominada **elemento de respuesta al cAMP (CRE)**. La subunidad catalítica de la proteína quinasa A, liberada al aumentar los niveles de cAMP (véase la Fig. 12-6), entra en el núcleo y fosforila una proteína nuclear, la **proteína de unión al CRE (CREB)**. Una vez fosforilada, la CREB se une a los CRE cerca de determinados genes y actúa como un factor de transcripción, activando la expresión de esos genes.

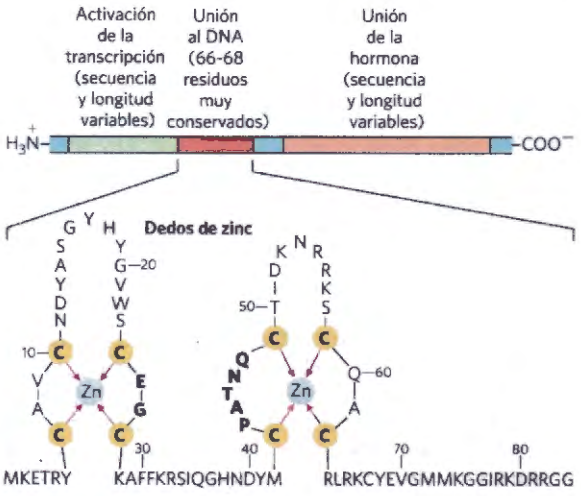


FIGURA 28-34 Receptores típicos de hormonas esteroides. Estos proteínas receptoras poseen un sitio de unión para la hormona, un dominio de unión al DNA y una región que activa la transcripción del gen regulado. El muy conservado dominio de unión al DNA posee dos dedos de zinc. La secuencia aquí mostrada corresponde al receptor de los estrógenos, pero los residuos en negrita son comunes a todos los receptores de las hormonas esteroides.

Muchos mRNA eucarióticos están sometidos a represión traduccional

La regulación a nivel de traducción asume un papel mucho más destacado en los eucariotas que en las bacterias y se observa en una variedad de situaciones celulares. En contraste con el estrecho acoplamiento entre la transcripción y la traducción en las bacterias, los transcritos generados en un núcleo eucariótico tienen que ser procesados y transportados hacia el citoplasma antes de la traducción. Esto puede imponer un retraso significativo en la aparición de una proteína. Cuando se requiere un incremento rápido de la producción de una proteína, un mRNA reprimido traduccionalmente que ya está presente en el citoplasma puede ser activado para que sea traducido sin retraso. La regulación de la traducción puede desempeñar un papel especialmente importante en la regulación de ciertos genes eucarióticos muy largos (algunos se miden en millones de pares de bases), para los que la transcripción y maduración del mRNA puede requerir muchas horas. Algunos genes se regulan tanto en las etapas de transcripción como de traducción; esta última está implicada en el ajuste preciso de los niveles de proteínas celulares. En algunas células anucleadas, tales como los reticulocitos (eritrocitos inmaduros), el control transcripcional es totalmente inasequible y el control traduccional de los mRNA almacenados se convierte en esencial. Tal como se describirá posteriormente, los controles de la traducción pueden tener también un significado espacial durante el desarrollo, donde la traducción regulada de mRNA preposicionados crea un gradiente local del producto proteico.

Los eucariotas tienen al menos cuatro mecanismos principales de regulación de la traducción:

1. Los factores de inicio de la traducción están sujetos a fosforilación por diversas proteína quinasas. Las formas fosforiladas son a menudo menos activas y provocan una depresión general de la traducción en la célula.
2. Algunas proteínas se unen directamente al mRNA y actúan como represores traduccionales; muchas de ellas se unen a sitios específicos de la región 3' no traducida (3'UTR). Una vez posicionadas, estas proteínas interaccionan con otros factores de inicio de la traducción unidos al mRNA o con la subunidad ribosómica 40S para impedir el inicio de la traducción **(Fig. 28-35)**.
3. Proteínas de unión, presentes en los eucariotas desde las levaduras hasta los mamíferos, impiden la interacción entre eIF4E y eIF4G (véase la Fig. 27-28). Las proteínas de los mamíferos se denominan 4E-BP (proteínas de unión a eIF4E). Cuando el crecimiento celular es lento, estas proteínas limitan la traducción uniéndose al sitio de eIF4E que normalmente interacciona con eIF4G. Cuando se reanuda o aumenta el crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento u otros estímulos, las proteínas de unión se

inactivan mediante fosforilación dependiente de proteína quinasas.

4. La regulación de la expresión génica dependiente de RNA, examinada más adelante, a menudo se produce a nivel de la represión de la traducción.

La variedad de mecanismos de regulación traduccional proporciona una gran flexibilidad y permite la represión de sólo algunos mRNA o la regulación global de toda la traducción celular.

La regulación de la traducción ha sido especialmente bien estudiada en los reticulocitos. Uno de los mecanismos presentes en estas células utiliza el eIF2, el factor de inicio que se une al tRNA de inicio, y lo transporta al ribosoma; cuando el Met-tRNA se ha unido al sitio P, el factor eIF2B se une a eIF2, reciclándolo con la ayuda de la unión e hidrólisis de GTP. La maduración de los reticulocitos implica la destrucción del núcleo celular, que deja atrás una membrana plasmática llena de hemoglobina. Los RNA mensajeros presentes en el citoplasma antes de la pérdida del núcleo permiten la reposición de la hemoglobina. Cuando los reticulocitos se vuelven deficientes en hierro o en hemo, se reprime la traducción de los mRNA de la globina. Una proteína quinasa, denominada **HCR (represor controlado por hemina)** se activa y cataliza la fosforilación de eIF2. En su forma fosforilada, eIF2 forma un complejo estable con eIF2B que secuestra eIF2, impidiendo que esté disponible para participar en la traducción. De esta manera, el reticulocito coordina la síntesis de globina de acuerdo con la disponibilidad de hemo.

Se han encontrado muchos ejemplos adicionales de regulación de la traducción en estudios del desarrollo de organismos multicelulares, tema que trataremos con mayor detalle más adelante.

El silenciamiento postranscripcional de los genes se produce por interferencia mediante RNA

En los eucariotas superiores, incluidos los nemátodos, las moscas del vinagre, las plantas y los mamíferos, los **micro-RNA (miRNA)** median el silenciamiento de muchos genes. En un fenómeno descrito por primera vez por Craig Mello y Andrew Fire, estos RNA actúan interaccionando con el mRNA, a menudo en el 3'UTR, provocando tanto la degradación del mRNA o la inhibición de su traducción. En ambos casos, el mRNA, y por tanto el gen que lo produce, es silenciado. Esta forma de regulación génica controla las etapas del desarrollo en al menos algunos organismos. También se usa como un mecanismo de protección frente a RNA de virus invasores (de particular importancia en las plantas que carecen de sistema inmunitario) y para controlar la actividad de los transposones. Además, estas pequeñas moléculas de RNA pueden jugar un papel fundamental (pero todavía por definir) en la formación de la heterocromatina.



Craig Mello
[Fuente: Cortesía de Craig Mello.]



Andrew Fire
[Fuente: Linda A. Cicero/ Stanford News Service.]

Muchos miRNA sólo están presentes de forma transitoria durante el desarrollo y, a veces, se denominan **RNA temporales pequeños (stRNA)**. En los eucariotas superiores se han identificado millares de miRNA diferentes, que pueden influir en la regulación de un tercio de los genes de los mamíferos. Se transcriben en forma de un RNA precursor de unos 70 nucleótidos de longitud, con secuencias internas complementarias que forman estructuras en horquilla. Los detalles de la maduración de los miRNA se han descrito en el Capítulo 26 (véase la Fig. 26-27). Los precursores se cortan con endonucleasas como Drosha y Dicer para formar dúplex cortos de 20 a 25 nucleótidos de longitud. Una de las hebras del miRNA maduro se asocia con el mRNA diana (o con el RNA de un virus o de un transposón), provocando la inhibición de la traducción o la degradación del mRNA **(Fig. 28-36)**. Algunos miRNA se unen y afectan a un único mRNA por lo que sólo afectan a la expresión de un gen. Otros interaccionan con múltiples mRNA y, por tanto, constituyen el núcleo del mecanismo de los regulones que coordinan la expresión de una multiplicidad de genes.

Este mecanismo de regulación génica tiene un aspecto que lo hace muy útil e interesante desde un punto de vista práctico. Si se introduce en un organismo una molécula de RNA dúplex, correspondiente a la secuencia de prácticamente cualquier mRNA, la endonucleasa Dicer corta el dúplex en fragmentos cortos denominados **RNA de interferencia pequeños (siRNA)**. Estos fragmentos se unen al mRNA y lo silencian. (Fig. 28-36b). El proceso se conoce como **interferencia por RNA (RNAi)**. En las plantas, prácticamente cualquier gen puede ser silenciado de esta manera. Los nematodos pueden ingerir rápidamente RNAs funcionales enteros, y la simple introducción del RNA dúplex en la dieta de los gusanos produce la supresión efectiva del gen diana. La técnica es una herramienta

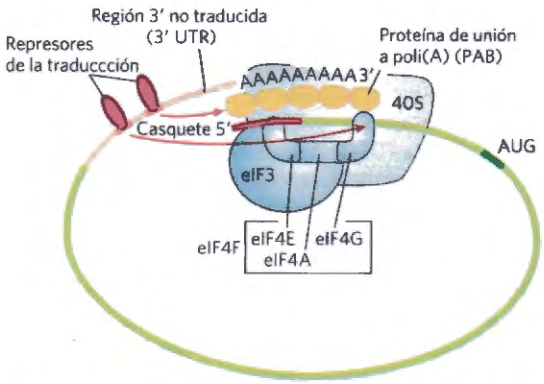


FIGURA 28-35 Regulación traduccional de mRNA eucarióticos. Uno de los mecanismos de regulación de la traducción más importantes en los eucariotas se basa en la unión de represores de la traducción (proteínas de unión al RNA) a sitios específicos de la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA. Estas proteínas interaccionan con factores de inicio eucarióticos o con el ribosoma para impedir o disminuir la traducción.

Copy Station

importante en los esfuerzos actuales para estudiar la función génica, porque puede suprimirla sin necesidad de crear un organismo mutante. Este procedimiento también se puede aplicar en humanos. Se han usado siRNA sintetizados en el laboratorio para bloquear el VIH y las infecciones por poliovirus en células humanas en cultivo durante una semana aproximadamente. La aplicación más amplia de terapias basadas en RNAi fue inicialmente bloqueada por la dificultad inherente en la entrega de moléculas de RNAi a su objetivo requerido, dadas las numerosas nucleasas que degradan el RNA en tejidos humanos. Con los reciente avances en los métodos de entrega, ahora hay más de una docena de terapias con RNAi en ensayos clínicos avanzados para tratar una serie de condiciones, desde polineuropatía amiloidea familiar hasta infecciones virales y cáncer.

La regulación de la expresión génica debida al RNA adopta múltiples formas en eucariotas

Los RNA de función especializada de los eucariotas incluyen los miRNA descritos anteriormente; los snRNA, que intervienen en el corte y empalme del RNA (véase la Fig. 26-16); los snoRNA, implicados en la modificación del rRNA (véase la Fig. 26-25) y los lncRNAs, ya tratados en este capítulo. Todos estos RNAs, como todos los RNAs (independientemente de su longitud) que no codifican proteínas, incluidos los rRNA y los tRNA, se designan genéricamente como **ncRNA** (**RNA no codificantes**). Los genomas de los mamíferos parecen codificar más ncRNA que RNA codificantes. No es, pues, sorprendente que continúen descubriéndose nuevas clases funcionales de ncRNA. Aquí se describen algunos ejemplos de ncRNA que participan en la regulación génica, los cuales se designan como lncRNAs cuando su longitud excede los 200 nucleótidos.

COPY-STATION

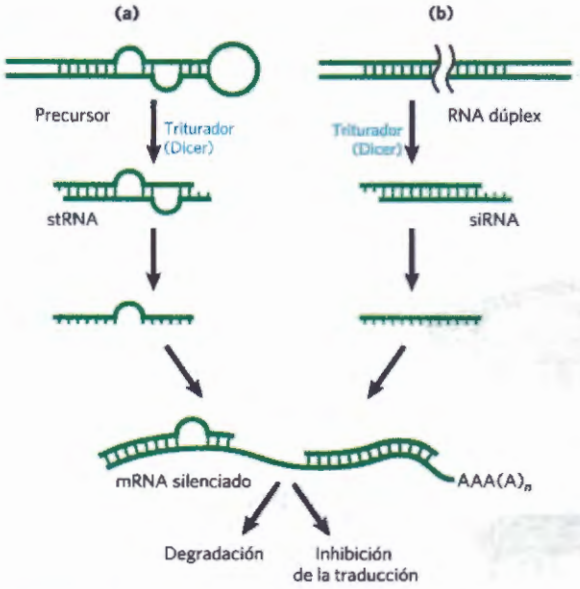


FIGURA 28-36 Silenciamiento de genes por RNA de interferencia. **(a)** RNAs pequeños transitorios (stRNAs, un tipo de miRNAs) son generados por el enzima triturador DICER a partir de precursores largos y plegados para crear regiones de doble cadena. Los stRNA se unen a los mRNA, provocando la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción. **(b)** Se pueden construir RNA de doble cadena para introducirlos en las células. El triturador corta el dúplex de RNA en pequeños RNA (siRNA) de interferencia, que interaccionan con el RNA diana. A su vez se degrada o se inhibe la traducción del mRNA.

El factor 1 del choque térmico (HFS-1) es una proteína activadora que, en células no estresadas, se encuentra como un monómero unido a la chaperona Hsp90. En condiciones de estrés, el HSF-1 se disocia de la Hsp90 y trimeriza. El trímero de HSF-1 se une al DNA y activa la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para afrontar el estrés. Un ncRNA, denominado HSR1 (RNA 1 del choque térmico; ~600 nucleótidos) estimula la trimerización de HSF1 y la unión al DNA. El HSR1 no actúa solo; funciona como un complejo con el factor de elongación de la traducción eEF1A.

Otros RNA afectan la transcripción de diversos modos. Un ncRNA de 331 nucleótidos, denominado 7SK, abundante en los mamíferos, se une al factor de elongación de la transcripción p-TEFb (véase la Tabla 26-2) de Pol II y reprime la elongación del transcrito. El ncRNA B2 (~178 nucleótidos), se une directamente a Pol II durante el choque térmico y reprime la transcripción. Pol II unida a B2 puede formar parte de un PIC estable, pero la transcripción está bloqueada. El RNA B2 bloquea, pues, la transcripción de muchos genes durante el choque térmico. Se desconoce aún el mecanismo que permite la expresión de los genes que responden a HSF-1 en presencia de B2.

Los papeles conocidos de los ncRNA en la expresión génica y otros procesos celulares siguen expandiéndose rápidamente. Al mismo tiempo, el estudio de la bioquímica del la regulación génica está cada vez menos centrado en las proteínas.

El desarrollo está controlado por cascadas de proteínas reguladoras

Por su gran complejidad y complicada coordinación, los patrones de regulación génica que rigen el desarrollo desde el zigoto hasta un animal o planta multicelular no tienen parangón. El desarrollo requiere transformaciones de morfología y de composición proteica que dependen de cambios estrechamente coordinados en la expresión del genoma. Se expresan más genes durante el desarrollo temprano que en ningún otro momento del ciclo vital. Por ejemplo, el oocito del erizo de mar tiene alrededor de 18.500 mRNA *diferentes*, en comparación con los aproximadamente 6.000 mRNA diferentes de las células de un tejido diferenciado típico. Los mRNA del oocito dan lugar a una cascada de sucesos que regulan la expresión de muchos genes tanto en el espacio como en el tiempo.

Varios organismos se han convertido en importantes sistemas modelo para el estudio del desarrollo, ya que son fáciles de mantener en el laboratorio y tienen un tiempo de generación relativamente corto. Entre ellos se encuentran los nemátodos, las moscas del vinagre, el pez cebra, los ratones y la planta *Arabidopsis*. Esta discusión se centra en el desarrollo de las moscas del vinagre. Nuestra comprensión de los procesos moleculares durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* es especialmente detallada y puede ser útil para ilustrar patrones y principios de significación general.

El ciclo vital de la mosca del vinagre incluye la metamorfosis completa durante su progreso desde embrión hasta adulto **(Fig. 28-37)**. Entre las características más importantes del embrión están la **polaridad** (las partes anterior y posterior del animal son fácilmente distinguibles, al igual que sus partes dorsal y ventral) y el **metamerismo** (el cuerpo del embrión está compuesto por una serie de segmentos repetidos, cada uno con propiedades características). Durante el desarrollo, estos segmentos se organizan en cabeza, tórax y abdomen. Cada segmento del tórax del adulto tiene un conjunto de apéndices diferentes. El desarrollo de este patrón complejo se encuentra bajo control genético, y se han descubierto diversos genes reguladores del patrón que afectan profundamente la organización del cuerpo.

El huevo de *Drosophila*, junto con 15 células nodriza, está rodeado por una capa de células foliculares **(Fig. 28-38)**. A medida que se forma la célula huevo (antes de la fecundación), los mRNA y proteínas que se originan en las células nodriza y foliculares se depositan en la célula huevo, donde desempeñan un papel determinante en el desarrollo. Una vez puesto el huevo fertilizado, su núcleo se divide y sus descendientes nucleares continúan dividiéndose sincrónicamente cada 6 a 10 min. Las membranas plasmáticas no se forman alrededor de estos núcleos, sino que éstos se distribuyen dentro del citoplasma del huevo (formando un sincitio). Al cabo de ocho a once ciclos de división nuclear, los núcleos migran hacia la capa externa del huevo, formando una monocapa de núcleos que rodea el citoplasma común rico en yema; éste es el blastodermo sincitial. Después de algunas divisiones adicionales, invaginaciones de la membrana envuelven los núcleos para crear una capa de células que forman el blastodermo celular. En esta fase, los ciclos mitóticos de las células pierden su sincronía. El destino de las células en el desarrollo viene determinado por los mRNA y las proteínas depositadas originalmente en el huevo por las células nodriza y foliculares.



Christiane Nüsslein-Volhard [Fuente: L'Oréal/Micheline Pelletier.]



Edward B. Lewis, 1918-2004 [Fuente: CalTech Archives, California Institute of Technology.]



Eric F. Wieschaus [Fuente: Cortesía de Eric F. Wieschaus.]

Las proteínas cuya concentración o actividad local provocan que el tejido circundante adopte una forma o estructura particular a veces se denominan **morfógenos**; son los productos de los genes reguladores del patrón. Tal como definieron Christiane Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis y Eric F. Wieschaus, tres clases principales de genes que regulan el patrón (maternos, de segmentación y homeóticos) actúan en sucesivos estadios del desarrollo para especificar las características básicas del cuerpo embrionario de *Drosophila*. Los **genes maternos** se expresan en el huevo no fecundado y los **mRNA maternos** resultantes permanecen latentes basta la fecundación. Estos proporcionan la mayoría de las proteínas necesarias en el desarrollo más temprano, hasta que se forma el blastodermo celular. Algunas de las proteínas codificadas por los mRNA maternos dirigen la organización espacial del embrión en desarrollo en estadios tempranos, estableciendo su polaridad. Los **genes de segmentación** se transcriben después de la fecundación y dirigen la formación del número correcto de segmentos corporales. Al menos tres subclases de genes de segmentación actúan en etapas sucesivas: los **genes gap**

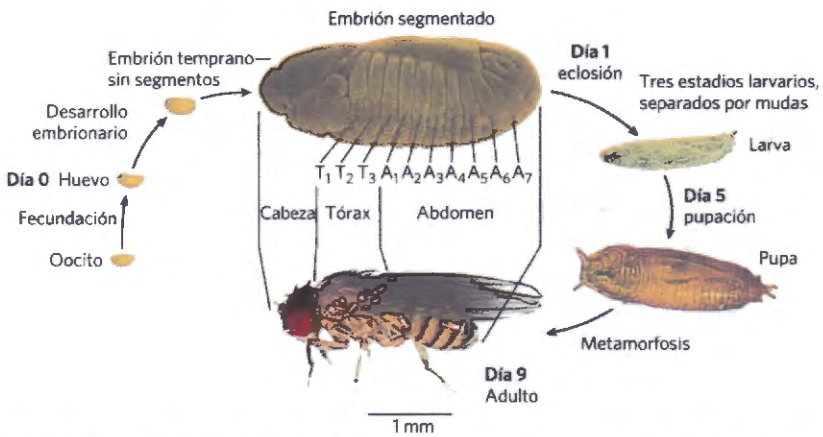


FIGURA 28-37 Ciclo vital de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* experimenta una metamorfosis completa, lo que significa que la forma del insecto adulto es radicalmente diferente de sus estadios inmaduros, una transformación que requiere extensas alteraciones durante el desarrollo. Hacia el estadio embrionario tardío, se han formado los segmentos, cada uno contiene estructuras especializadas a partir de las cuales se desarrollarán varios apéndices y otras características en la mosca adulta. [Fuentes: Embrión tardío : Cortesía de F. R. Turner, Departamento de Biología, University of Indiana, Bloomington. Otras fotografías: Cortesía de Prof. Dr. Christian Klambt, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie.]

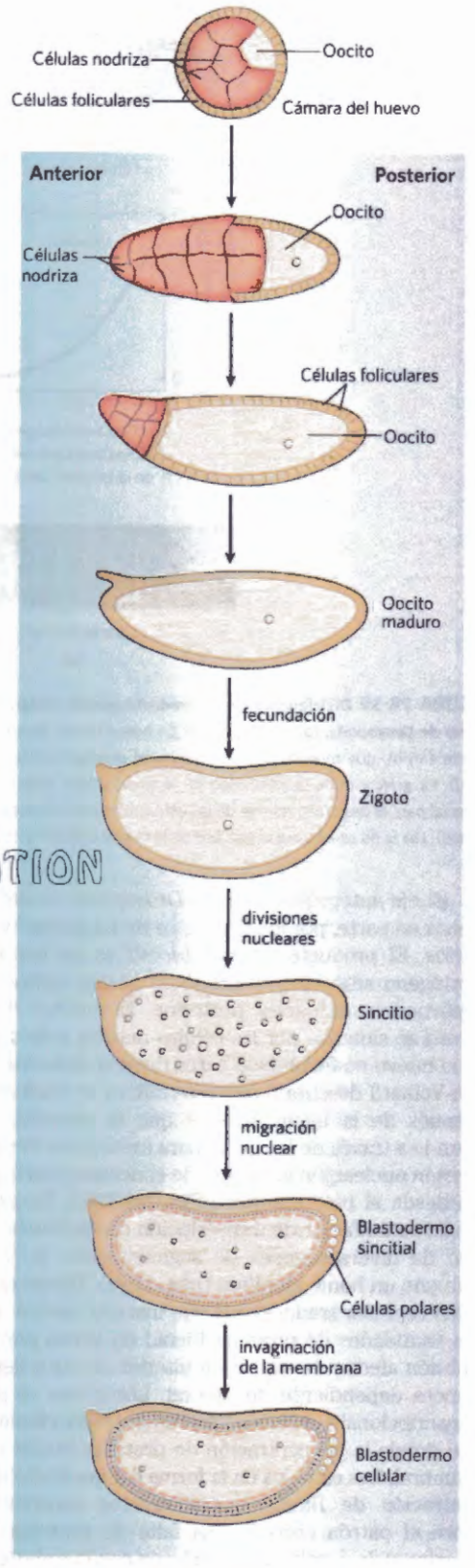


FIGURA 28-38 Desarrollo temprano en *Drosophila*. Durante el desarrollo del huevo se depositan mRNA maternos (incluyendo los transcritos de los genes *bicoid* y *nanos*, que se tratan en el texto) y proteínas en el oocito en desarrollo (célula huevo no fecundada) por mediación de células nodriza y células foliculares. Después de la fecundación, los dos núcleos del huevo fecundado se dividen en sincronía en el citoplasma común (sincitio) y a continuación emigran hacia la periferia. Invaginaciones de la membrana rodean los núcleos para formar una monocapa de células en la periferia; ésta es la fase de blastodermo celular. Durante las divisiones nucleares tempranas, varios núcleos en el extremo más posterior se convierten en células polares que se transforman más tarde en células de la línea germinal.

dividen el embrión en desarrollo en varias regiones amplias; los **genes de la regla par** junto con los **genes de la polaridad de los segmentos** definen 14 bandas que se convierten en los 14 segmentos de un embrión normal. Los **genes homeóticos** se expresan todavía más tarde; especifican qué órganos y apéndices se desarrollarán en los distintos segmentos corporales.

Los numerosos genes reguladores de estas tres clases dirigen el desarrollo de una mosca adulta con una cabeza, un tórax, y un abdomen, con el número adecuado de segmentos y con los apéndices correctos en cada segmento. Aunque la embriogénesis tarda cerca de un día en completarse, todos estos genes se activan durante las primeras cuatro horas. Algunos mRNAs y proteínas están presentes sólo durante unos pocos minutos en puntos específicos durante este periodo. Algunos de los genes codifican factores de transcripción que afectan la expresión de otros genes en una especie de cascada de desarrollo. También se da la regulación a nivel de la traducción y muchos genes reguladores codifican represores de la traducción, la mayoría de los cuales se unen al 3'UTR del mRNA (Fig. 28-35). Debido a que muchos mRNA se depositan en el huevo mucho antes de que se requiera su traducción, la represión de la traducción constituye una vía especialmente importante para la regulación de las rutas del desarrollo.

COPYSTATION

Genes maternos Algunos genes maternos se expresan en las células nodriza y foliculares y algunos en el propio huevo. En el huevo de *Drosophila* no fecundado, los productos génicos maternos establecen dos ejes: el antero-posterior y el dorso-ventral, y por tanto definen qué regiones del huevo radialmente simétrico se desarrollarán para dar la cabeza y el abdomen, así como la parte dorsal y ventral de la mosca adulta.

Si todas las células se dividiesen produciendo dos células hijas idénticas, los organismos multicelulares nunca serían algo más que una bola de células idénticas. La generación de diferentes destinos celulares requiere divisiones celulares asimétricas programadas. Un hecho clave muy al principio del desarrollo es el establecimiento de gradientes de mRNA y proteínas a lo largo de los ejes corporales. Algunos mRNA maternos tienen productos proteicos que difunden a través del citoplasma para crear una distribución asimétrica en el huevo. Diferentes células en el blastodermo celular reciben, por tanto, cantidades diferentes de estas proteínas, que sitúan las células en diferentes vías del desarrollo. Los productos de los mRNA maternos incluyen activadores o represores transcripcionales, así como represores traduccionales; todos ellos regulan la expresión de otros genes reguladores del patrón. Los patrones específicos resultantes y las secuencias de expresión génica difieren, por tanto, entre las distintas líneas celulares que, en último término, dirigen el desarrollo de cada estructura adulta.

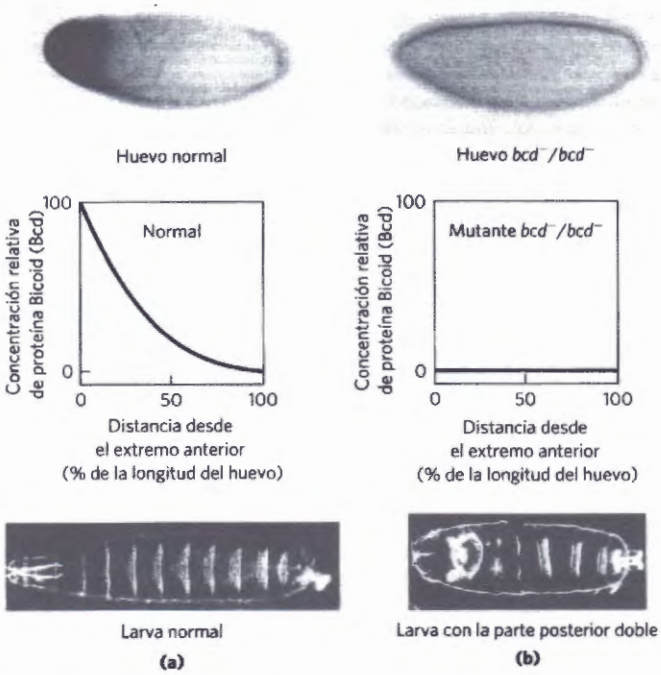


FIGURA 28-39 Distribución de un producto génico materno en un huevo de *Drosophila*. **(a)** Micrografía de un huevo teñido inmunológicamente (arrib), que muestra la distribución del producto del gen *bicoid* (*bcd*). La gráfica mide la intensidad de la tinción. Esta distribución es esencial para el desarrollo normal de las estructuras anteriores del animal (abajo). **(b)** Si no se expresa el gen *bcd* en la madre (mutante *bcd*⁻/*bcd*⁻) y, por lo tanto, no se deposita en el huevo mRNA *bicoid*, el embrión resultante tiene dos partes posteriores (y muere pronto).[Fuente: Republicado con permisos de Elsevier, de "The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner" por Wolfgang Driever y Christiane Nüsslein-Volhard, *Cell* 54:83-93, July 1, 1988; permiso expresado a través de Copyright Clearance Center, Inc.]

COPY-STATION

El eje antero-posterior de *Drosophila* se define, al menos en parte, por los productos de los genes *bicoid* y *nanos*. El producto del gen *bicoid* es un importante morfógeno anterior y el producto génico *nanos* es un importante morfógeno posterior. El mRNA del gen *bicoid* se sintetiza por las células nodriza y se deposita en el huevo no fecundado cerca del polo anterior. Nüsslein-Volhard descubrió que este mRNA se traduce poco después de la fecundación y que la proteína Bicoid difunde a través de la célula, para crear hacia la séptima división nuclear, un gradiente de concentración que irradia desde el polo anterior **(Fig. 28-39a)**. La proteína Bicoid es un factor de transcripción que activa la expresión de diversos genes de segmentación; la proteína contiene un homeodominio (pág. 1135). Bicoid también es un represor traduccional que inactiva ciertos mRNA. Las cantidades de proteína Bicoid en varias partes del embrión afectan la expresión ulterior de otros genes de manera dependiente de umbral. Los genes se activan transcripcionalmente o se reprimen traduccionalmente sólo donde la concentración de proteína Bicoid excede el umbral. Los cambios en la forma del gradiente de concentración de Bicoid tienen efectos espectaculares sobre el patrón corporal. La falta de proteína Bicoid provoca el desarrollo de un embrión con dos abdómenes, pero sin cabeza ni tórax (Fig. 28-39b); no obstante, estos embriones sin Bicoid se desarrollan de manera normal si se inyecta una cantidad adecuada de mRNA *bicoid* en el extremo apropiado del huevo. El gen *nanos* tiene un papel análogo, pero su mRNA se deposita en el extremo posterior del huevo y el gradiente proteico antero-posterior llega a su punto más alto en el polo posterior. La proteína Nanos es un represor traduccional.

Una visión más amplia de los efectos de los genes maternos revela los aspectos fundamentales de un circuito del desarrollo. Además de los mRNA *bicoid* y *nanos*, que se depositan en el huevo asimétricamente, otros mRNA maternos se depositan uniformemente en todo el citoplasma del huevo. Tres de estos mRNA codifican las proteínas Pumilio, Hunchback y Caudal, todas ellas afectadas por *nanos* y *bicoid* **(Fig. 28-40)**. Caudal y Pumilio intervienen en el desarrollo del extremo posterior de la mosca. Caudal es un activador transcripcional con un homeodominio; Pumilio es un represor traduccional. La proteína Hunchback desempeña un papel importante en el desarrollo de la parte anterior de la mosca y también es un regulador transcripcional de varios genes, siendo en algunos casos un regulador positivo y en otros casos, negativo. Bicoid suprime la traducción de *caudal* en el extremo anterior y también actúa como un activador transcripcional de *hunchback* en el blastodermo celular. Debido a que *hunchback* se expresa tanto a partir de mRNA maternos como de genes del huevo en desarrollo, se considera tanto un gen materno como un gen de segmentación. El resultado de las actividades de Bicoid es un incremento de la concentración de Hunchback en el extremo anterior del huevo. Las proteínas Nanos y Pumilio actúan como represores traduccionales de *hunchback*, suprimiendo la síntesis de su proteína cerca del extremo posterior del huevo. Pumilio no funciona en ausencia de la proteína Nanos y el gradiente de la expresión de Nanos limita

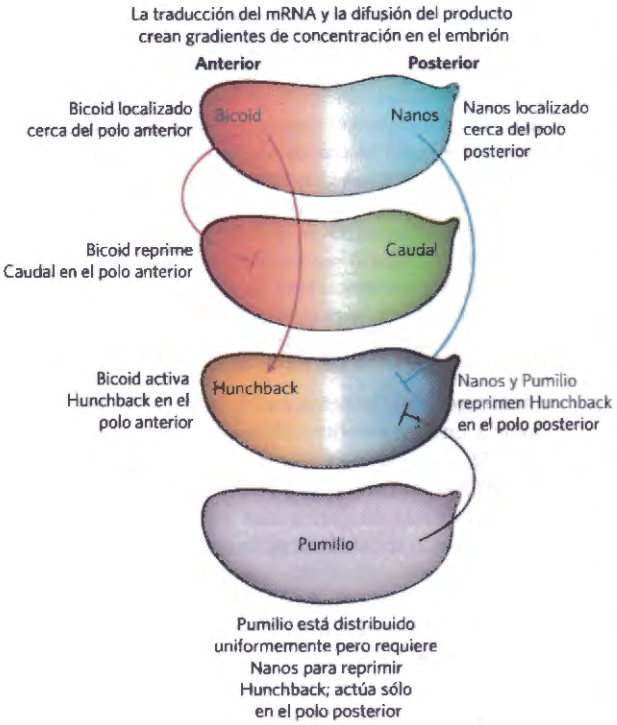


FIGURA 28-40 Circuitos reguladores del eje antero-posterior en un huevo de *Drosophila*. Los mRNA *bicoid* y *nanos* se localizan cerca de los polos anterior y posterior, respectivamente. Los mRNA *caudal*, ***hunchback***, y *pumilio* se distribuyen de manera uniforme por todo el citoplasma del huevo. Los gradientes de proteínas Bicoid (Bcd) y Nanos afectan a la expresión de los mRNA *caudal* y *hunchback* tal como se muestra y dan lugar a la acumulación de proteína Hunchback en la parte anterior y de proteína Caudal en la parte posterior del huevo. Debido a que la proteína Pumilio requiere la proteína Nanos para su actividad como represor de la traducción de *hunchback*, sólo actúa en el extremo posterior.

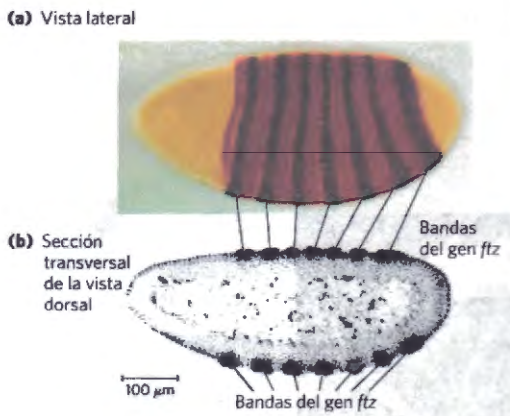


FIGURA 28-41 Distribución del producto del gen fushi tarazu (ftz) en embriones tempranos de *Drosophila*. **(a)** Después de un procedimiento de tinción específica de gen, el producto génico se puede detectar en siete bandas que circundan al embrión. **(b)** Estas bandas aparecen como manchas oscuras (generadas por una marca radiactiva) en una autorradiografía de una sección transversal, y marcan los márgenes anteriores de los segmentos en el embrión tardío. [Fuentes: **(a)** Cortesía de Stephen J. Small, Departamento de Biología, New York University. **(b)** Cortesía de Phillip Ingham, Imperial College London.]

la actividad de ambas proteínas a la región posterior. La represión traduccional del gen *hunchback* provoca la degradación del mRNA de *hunchback* cerca del extremo posterior. Sin embargo, la falta de proteína Bicoid en la parte posterior promueve la expresión de *caudal*. De esta manera, las proteínas Hunchback y Caudal acaban distribuidas asimétricamente en el huevo.

Genes de segmentación Los genes gap, los genes de la regla par y los genes de la polaridad de los segmentos, tres subclases de genes de segmentación en *Drosophila*, se activan en fases sucesivas del desarrollo embrionario. La expresión de los genes gap está regulada generalmente por los productos de uno o más genes maternos. Al menos alguno de los genes gap codifica factores de transcripción que afectan la expresión de otros genes de segmentación u homeóticos (tardíos).

Un gen de segmentación bien caracterizado es *fushi tarazu* (*ftz*), de la subclase de la regla par. Cuando se elimina *ftz*, el embrión desarrolla siete segmentos en lugar de los 14 normales, cada segmento con el doble de la anchura normal. La proteína Fushi-tarazu (Ftz) es un activador transcripcional con un homeodominio. Los mRNA y las proteínas derivadas del gen *ftz* normal se acumulan en un patrón espectacular de siete bandas que rodea los dos tercios posteriores del embrión **(Fig. 28-41)**. Las bandas delimitan las posiciones de los segmentos que se desarrollarán posteriormente; estos segmentos desaparecen si se pierde la función *ftz*. La proteína Ftz y algunas proteínas reguladoras similares regulan directa o indirectamente la expresión de un gran número de genes en la cascada del desarrollo.

Genes homeóticos Un conjunto de 8 a 11 genes homeóticos dirige la formación de estructuras particulares en lugares determinados del organismo. Estos genes se denominan comúnmente **genes *Hox***, término derivado de "homeosecuencia", la secuencia génica conservada que codifica el homeodominio y que está presente en todos estos genes. A pesar de su denominación, estas no son las únicas proteínas relacionadas con el desarrollo que contienen un homeodominio (por ejemplo, el producto del gen *bicoid*, descrito anteriormente contiene un homeodominio), y "Hox" es más una clasificación funcional que estructural. Los genes *Hox* están organizados en agrupamientos genómicos. *Drosophila* tiene un agrupamiento de este tipo y los mamíferos tienen cuatro **(Fig. 28-42)**. Los genes de estos agrupamientos son sorprendentemente similares desde los nemátodos hasta los humanos. En *Drosophila*, cada uno de los genes *Hox* se expresa en un segmento particular del embrión y controla el desarrollo de la parte correspondiente de la mosca madura. La nomenclatura utilizada para describir los genes *Hox* puede resultar confusa. Tienen nombres históricos en la mosca del vinagre (por ejemplo, *ultrabithorax*), mientras que en los mamíferos coexisten dos sistemas para designar los agrupamientos, basados en letras (A, B, C, D) o en números (1, 2, 3, 4).

Todos los genes que promueven estadios diferentes del desarrollo deben reprimirse después que su función se haya completado. La expresión de los genes *Hox* se suprime por dos complejos, PRC1 y PRC2 (complejos represivos polycomb). PRC1 ubiquitina la histona H2A;

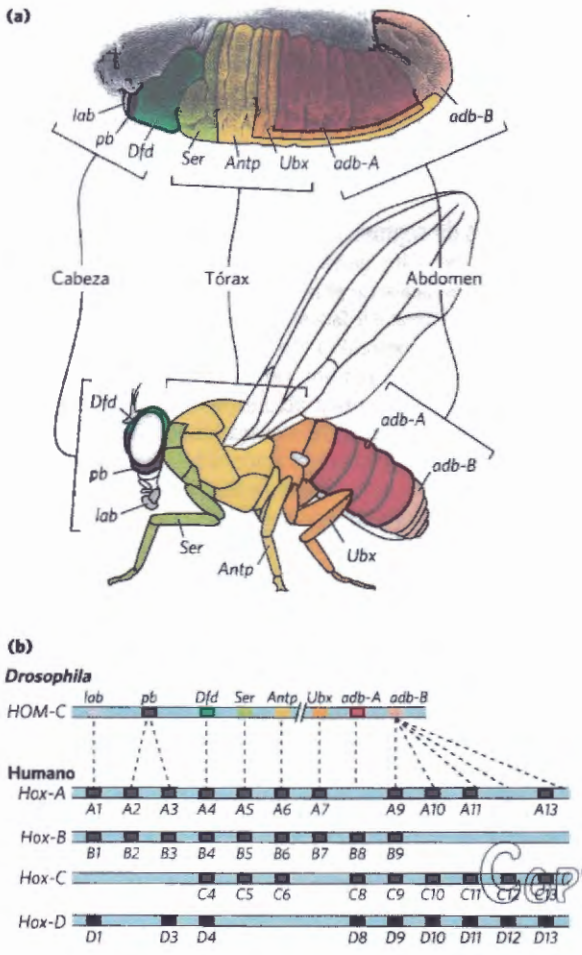


FIGURA 28-42 Los agrupamientos de genes Hox y su efecto sobre el desarrollo. **(a)** Cada gen *Hox* en la mosca del vinagre es responsable del desarrollo de estructuras en una parte definida del cuerpo y se expresa en regiones definidas del embrión, tal como se muestra aquí en código de colores. **(b)** *Drosophila* tiene un grupo de genes *Hox*, el genoma humano tiene cuatro. Muchos de estos genes están muy conservados en los animales multicelulares. Las relaciones evolutivas, puestas de manifiesto por los alineamientos de las secuencias de los genes *Hox* del agrupamiento de *Drosophila* con los agrupamientos de los genes *Hox* de los mamíferos, se muestran por líneas discontinuas. Relaciones similares entre los cuatro agrupamientos de los genes *Hox* de mamíferos se indican por alineamiento vertical. [Fuente: **(a)** F. R. Turner, University of Indiana, Departamento de Biología]

PRC2 metila la Lys^{27} en la histona H3. Estas modificaciones conducen a cambios estructurales en la cromatina que reducen los niveles de transcripción. Algunos lncRNAs desempeñan un papel en dirigir PRC1 y PRC2 a regiones cromosómicas donde se necesita un silenciamiento génico. Defectos en PRC1 y PRC2 pueden conducir a un crecimiento celular descontrolado, y la función de uno o ambos de estos complejos es a menudo perturbada en células tumorales.

La pérdida de genes *Hox* en la mosca del vinagre por mutación o deleción es la causa de la aparición de un apéndice o estructura corporal normal en una posición corporal inapropiada. Un ejemplo importante es el gen *ultrabithorax* (*ubx*). Cuando se pierde la función de Ubx, el primer segmento abdominal se desarrolla incorrectamente, adoptando la estructura del tercer segmento torácico. Otras mutaciones homeóticas conocidas son causa de la formación de un par de alas extra o dos patas en la posición de la cabeza donde normalmente se encuentran las antenas **(Fig. 28-43)**. Los genes *Hox* a menudo se extienden a lo largo de largas regiones del DNA. El gen *ubx*, por ejemplo, tiene una longitud de 77.000 pb. Más de 73.000 pb de este gen están en intrones, uno de los cuales tiene una longitud más de 50.000 pb. La transcripción del gen *ubx* tarda cerca de una hora. Se cree que esta demora en la expresión del gen *Ubx* es un mecanismo temporizador implicado en la regulación temporal de ulteriores fases del desarrollo. Muchos genes *Hox* son regulados además por miRNA codificados en las regiones intergénicas de los agrupamientos de los genes *Hox*. Todos los productos de los genes *Hox* son factores de transcrip-

Copy-Station

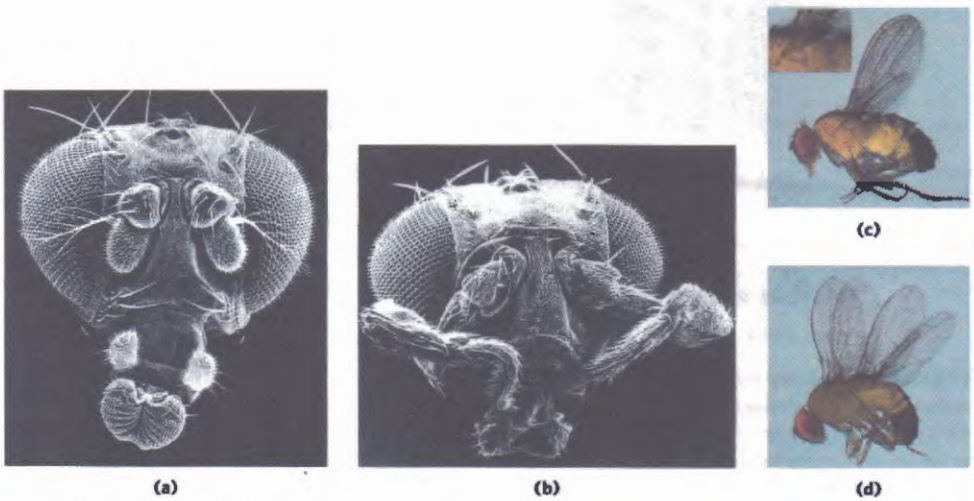


FIGURA 28-43 Efectos de mutaciones en genes Hox de *Drosophila*. **(a)** Cabeza normal. **(b)** Mutante homeótico (*antennapaedia*) en el que las antenas se han reemplazado por patas. **(c)** Estructura corporal normal. **(d)** Mutante homeótico (*bithorax*), en el que se desarrolla incorrectamente un segmento y produce un par de alas extra. [Fuente: (a,b) F. R. Turner, University of Indiana, Departamento de Biología (c,d) Cortesía de Nipam Patel, Patel Lab, Berkeley, California.]

ción que regulan la expresión de una serie de genes posteriores.

Muchos de los principios del desarrollo descritos anteriormente son aplicables a otros eucariotas desde los nemátodos hasta los humanos. Algunas de las proteínas reguladoras están conservadas. Por ejemplo, los productos de los genes con homeosecuencias *HOXA7* en el ratón y *antennapedia* de la mosca del vinagre difieren en un solo residuo aminoácido. Por supuesto, a pesar de que los mecanismos de regulación molecular pueden ser similares, muchos de los aspectos del desarrollo final no están conservados (los humanos no tienen ni alas ni antenas). El resultado final está determinado por las diferencias en los genes controlados por los genes *Hox*. El descubrimiento de determinantes estructurales con funciones moleculares identificables es el primer paso en la comprensión de los procesos moleculares subyacentes del desarrollo. A medida que se vayan descubriendo más genes y sus productos proteicos, las características bioquímicas de este inmenso rompecabezas se conocerán cada vez con mayor detalle.

El potencial de desarrollo de las células madre puede controlarse

Si podemos entender el desarrollo, y los mecanismos subyacentes de regulación génica, podremos controlarlo. Un humano adulto posee muchos tipos diferentes de tejidos. Muchas células están diferenciadas terminalmente y ya no se dividen. Si la función de un órgano está alterada por una enfermedad o se pierde un miembro por un accidente, los tejidos no pueden ser reemplazados. La mayoría de las células, debido a los procesos de regulación presentes, o incluso a la pérdida de parte o la totalidad del DNA genómico, no pueden reprogramarse con facilidad. La medicina ha hecho posible el transplante de órganos, pero los donantes son escasos y el rechazo sigue siendo un serio problema médico. Si los humanos pudiesen regenerar sus propios órganos o miembros o el tejido nervioso, el rechazo dejaría de ser un problema. La curación del fallo renal o de las enfermedades neurodegenerativas se harían realidad.

La clave para la regeneración de los tejidos reside en las **células madre**, células que han conservado la capacidad de diferenciarse en diversos tejidos. En los humanos, después de la fertilización del óvulo, las primeras divisiones celulares crean un agregado de células **totipotentes**, denominado la mórula, que tienen la capacidad de diferenciarse individualmente para dar cualquier tejido o incluso un organismo completo **(Fig. 28-44)**. La división celular continuada produce una esfera hueca, el blastocisto. Las células exteriores del blastocisto acabarán por formar la placenta. Las capas inferiores forman las capas germinales del feto en desarrollo, el ectodermo, el mesodermo y el ectodermo. Estas células son **pluripotentes**: pueden originar células de las tres capas germinales y pueden diferenciarse dando muchos tipos de tejidos. Sin embargo, no pueden originar un organismo completo. Algunas de estas células son **unipotentes**: pueden desarrollarse en un solo tipo de célula y/o tejido. Las células pluripotentes del blastocisto, las **células madre embrionarias**, son las que se usan corrientemente en la investigación de células madre.

Las células madre tienen dos funciones: reemplazarse a sí mismas y, al mismo tiempo, suministrar células que puedan diferenciarse. Estas tareas pueden realizarse de varias maneras **(Fig. 28-45a)**. Todas las células madre o parte de ellas pueden, en principio, estar implicadas en el reemplazamiento, la diferenciación o en ambos.

Otros tipos de células madre pueden utilizarse potencialmente con propósitos médicos. En el organismo adulto, las **células madre adultas**, producto de diferenciación adicional, tienen un potencial más limitado de desarrollo ulterior que las células madre embrionarias. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea pueden dar lugar a muchos tipos de células sanguíneas y también a células con capacidad de

COPYSTATION

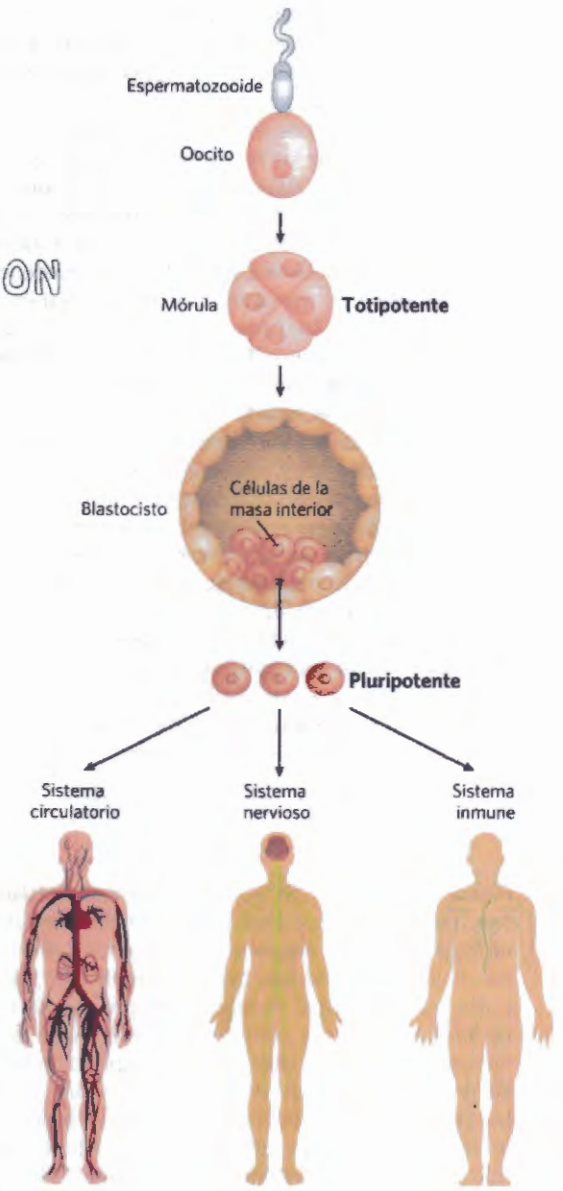


FIGURA 28-44 Células madre totipotentes y pluripotentes. Las células del estadio mórula son totipotentes y tienen capacidad para diferenciarse dando un organismo completo. La fuente de células madre embrionarias pluripotentes son las células de la masa interior del del blastocisto. Las células pluripotentes dan lugar a muchos tejidos pero no pueden formar organismos completos.

RECUADRO 28-1 Aletas, alas, picos y otras estructuras

En Sudamérica se encuentran varias especies de pinzones que se alimentan de semillas. Hace unos 3 millones de años, un pequeño grupo de pinzones de una sola especie emprendieron el vuelo desde la costa del Pacífico del continente. Tal vez arrastrados por una tormenta, perdieron de vista la costa y viajaron cerca de 1000 km. Estos pequeños pájaros deberían haber perecido durante semejante recorrido, pero contra toda probabilidad el grupo alcanzó una isla volcánica de un archipiélago recientemente formado, más tarde conocido como las Galápagos. Era un paisaje virgen con recursos alimenticios sin explotar y los pinzones recién llegados sobrevivieron. Con el paso de los años, se formaron nuevas islas que fueron colonizadas por nuevas plantas e insectos, y también por los pinzones. Los pájaros aprovecharon los nuevos recursos de las islas, y grupos de pájaros se fueron especializando gradualmente, originando nuevas especies. Cuando en 1835 Charles Darwin puso el pie en las islas, había muchas especies diferentes de pinzones en las diversas islas del archipiélago, que se alimentaban de semillas, frutos, insectos, polen e incluso sangre.

La diversidad de las criaturas vivientes fue causa de asombro para los humanos mucho antes de que los científicos se plantearan descubrir su origen. El extraordinario legado de Darwin, inspirado en parte por su encuentro con los pinzones de las Galápagos, supuso una explicación general para la existencia de organismos con una gran variedad de apariencias y características. También planteó muchas preguntas sobre los mecanismos de la evolución. Las respuestas a estas preguntas se han empezado a producir, primero a través del estudio de los genomas y del metabolismo de los ácidos nucleicos durante la segunda mitad del siglo XX y, más recientemente, a través de la disciplina emergente conocida como evo-devo, una mezcla de biología evolutiva y del desarrollo.

En su forma actual, la teoría de la evolución tiene dos elementos principales: las mutaciones en una población generan diversidad genética; la selección natural actúa a continuación sobre esta diversidad favoreciendo a los individuos con mayores capacidades genómicas y perjudicando a los restantes. Las mutaciones se producen a un ritmo significativo en el genoma de cualquier célula (véase la Sección 8.3). Las mutaciones ventajosas en organismos unicelulares o en la línea germinal de los organismos pluricelulares es más probable que se hereden (es decir, que se transmitan a un mayor número de descendientes) si son ventajosas. Es un esquema sencillo, pero muchos se han preguntado si es suficiente para explicar, por ejemplo, las muy diferentes formas de los picos de los pinzones de las Galápagos o la diversidad en tamaño y forma de los mamíferos. Hasta hace pocas décadas, había varias suposiciones ampliamente aceptadas sobre el proceso evolutivo: que eran necesarias muchas mutaciones y nuevos genes para crear nuevas estructuras físicas, que los organismos más complejos tendrían genomas mayores y que especies muy diferentes tendrían pocos genes en común. Todas estas suposiciones eran falsas.

La genómica moderna ha revelado que el genoma humano contiene menos genes de los esperados, no muchos más que la mosca del vinagre y menos que algunos genomas de anfibios. Los genomas de los mamíferos, desde los ratones a los humanos, son sorprendentemente similares en el número, tipos y disposición cromosómica de sus genes. Al mismo tiempo la evo-devo nos muestra las complejas y muy diferentes criaturas que pueden evolucionar a partir de estos genomas.

Los organismos mutantes mostrados en la Figura 28-43 fueron estudiados por el biólogo inglés William Bateson a finales del siglo XIX. Bateson usó sus observaciones para poner en duda el principio darwiniano según el cual el cambio evolutivo tenía que ser gradual. Estudios recientes de los genes que controlan el desarrollo de los organismos han revalorizado las ideas de Bateson. Cambios sutiles en los patrones de regulación durante el desarrollo, consistentes en una sola o unas pocas mutaciones pueden dar lugar a cambios físicos notables e impulsar cambios evolutivos sorprendentemente rápidos.

Los pinzones de las Galápagos son un magnífico ejemplo del vínculo entre evolución y desarrollo. Hay al menos 14 especies (15 según algunos investigadores) de pinzones en las Galápagos, que se distinguen en buena medida por la estructura de sus picos. Los pinzones de suelo, por ejemplo, poseen picos anchos y resistentes adaptados a triturar semillas grandes y duras. Los pinzones de los cactus poseen picos más

COPY STATION

regenerar el hueso. Se las conoce como **multipotentes**. Sin embargo, estas células no pueden diferenciarse en hígado, riñón o una neurona. A menudo se dice que las células madre adultas tienen un **nicho**, un microentorno que promueve el mantenimiento de las células madre y que a la vez permite la diferenciación de algunas células hijas que servirán de reemplazo de las células del tejido al que pertenecen (Fig.28-45b). Las células madre hematopoyéticas de la médula ósea ocupan un nicho en el que las señales de otras células y de otro tipo aseguran el mantenimiento del linaje de células madre. Al mismo tiempo, algunas células hijas se diferencian para cubrir las necesidades de células sanguíneas. La comprensión del nicho en el que operan las células madre y las señales producidas por el nicho es esencial en los esfuerzos para aprovechar el potencial de las células madre en la regeneración tisular.

Todas las células madre presentan problemas en sus aplicaciones médicas en humanos. Las células madre adultas tienen una capacidad limitada de regeneración de tejidos, están presentes en un pequeño número y son difíciles de aislar de un humano adulto. Las

largos y finos ideales para alimentarse de frutos y flores de cactus (Fig. 1). Clifford Tabin y colaboradores examinaron cuidadosamente un conjunto de genes que se expresan durante el desarrollo craneofacial de las aves. Identificaron un gen único, *Bmp4*, cuyo nivel de expresión podía relacionarse con la formación de los picos más robustos de los pinzones de suelo. También se formaban picos más robustos en los embriones de pollo cuando se expresaban artificialmente elevados niveles de Bmp4 en los tejidos apropiados lo que confirmaba la importancia de *Bmp4*. En un estudio similar, la formación de picos largos y finos pudo relacionarse con la expresión de calmodulina (véase la Fig. 12-12) en determinados tejidos en el estadio de desarrollo apropiado. Por tanto, cambios profundos en la forma y función del pico pueden ser el resultado de cambios sutiles en la expresión de solamente dos genes implicados en la regulación del desarrollo. Son necesarias muy pocas mutaciones, y éstas afectan al desarrollo. *No* se requieren nuevos genes.

El sistema de genes reguladores que dirige el desarrollo está notablemente conservado entre los vertebrados. La expresión elevada de *Bmp4* en el tejido y el momento adecuados da lugar a que las partes de la mandíbula sean más robustas en el pez cebra. El mismo gen juega un papel clave en el desarrollo de los dientes en los mamíferos. La expresión de un único gen, *Pax6*, desencadena el desarrollo de los ojos en la mosca del vinagre y en los mamíferos. El gen *Pax6* de ratón desencadena el desarrollo de ojos de mosca del vinagre en la mosca del vinagre y el gen *Pax6* de la mosca del vinagre desencadena el desarrollo de ojos de ratón en el ratón. En cada organismo estos genes son parte de una cascada de regulación mucho más amplia que finalmente crea las estructuras correctas en las localizaciones adecuadas en cada organismo. La cascada es antigua; por ejemplo, los genes *Hox* (descritos en el texto) han formado parte del programa de desarrollo de los eucariotas multicelulares durante más de 500 millones de años. Cambios sutiles en la cascada pueden tener grandes efectos sobre el desarrollo, y, por tanto, en la apariencia final del organismo. Estos mismos cambios sutiles pueden impulsar cambios evolutivos muy rápidos. Por ejemplo, las 400 o 500 especies de *Cichlidae* (peces de aletas radiadas) en el lago Malawi y el lago Victoria en el continente africano derivan de una o unas pocas poblaciones que colonizaron estos lagos hace unos 100.000 a 200.000 años. Los pinzones de las Galápagos simplemente siguieron el camino evolutivo y los cambios que las criaturas vivientes han seguido durante miles de millones de años.

COPY-STATION

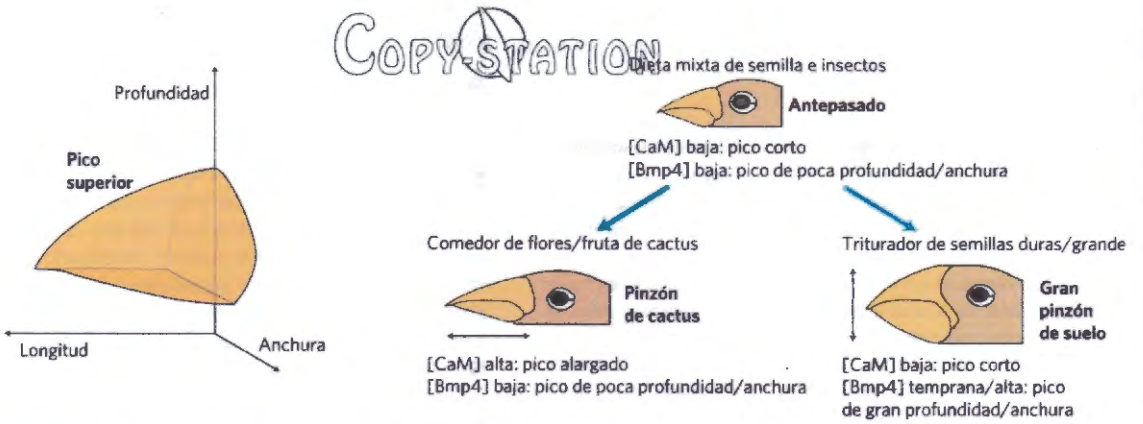


FIGURA 1 Evolución de nuevas estructuras del pico para aprovechar nuevas fuentes de alimento. En los pinzones de las Galápagos, las diferentes estructuras de los picos del pinzón de los cactus y del gran pinzón de suelo, que se alimentan de diferentes tipos especializados de comida, son el resultado en gran medida de unas pocas mutaciones que alteraron el momento y el nivel de expresión de sólo dos genes, los que codifican la calmodulina (CaM) y la Bmp4. [Fuente: Información de A. Abzhanov et al. *Nature* 442:563, 2006, Fig. 4.]

células madre embrionarias poseen un potencial de diferenciación mucho mayor y pueden cultivarse para producir grandes cantidades de células, pero su uso genera preocupaciones éticas por la destrucción de embriones humanos que comporta. La identificación de una fuente abundante y médicamente útil de células madre que no presente este tipo de problemas es un importante objetivo de la investigación médica.

La capacidad de cultivar células madre (es decir, mantenerlas en un estado indiferenciado) y manipularlas para que se dividan y se diferencien en tejidos particulares depende en gran medida de nuestros conocimientos de biología del desarrollo. James Thomson y colaboradores lograron en 1998 la identificación y el cultivo de células madre pluripotentes a partir de blastocistos humanos. Este avance hizo posible disponer de líneas celulares establecidas para la investigación.

Hasta ahora se han utilizado sobre todo células madre embrionarias humanas y de ratón en la investigación. Aunque ambos tipos de células madre son pluripotentes, requieren condiciones de cultivo muy diferentes, optimizadas para garantizar la división indefinida

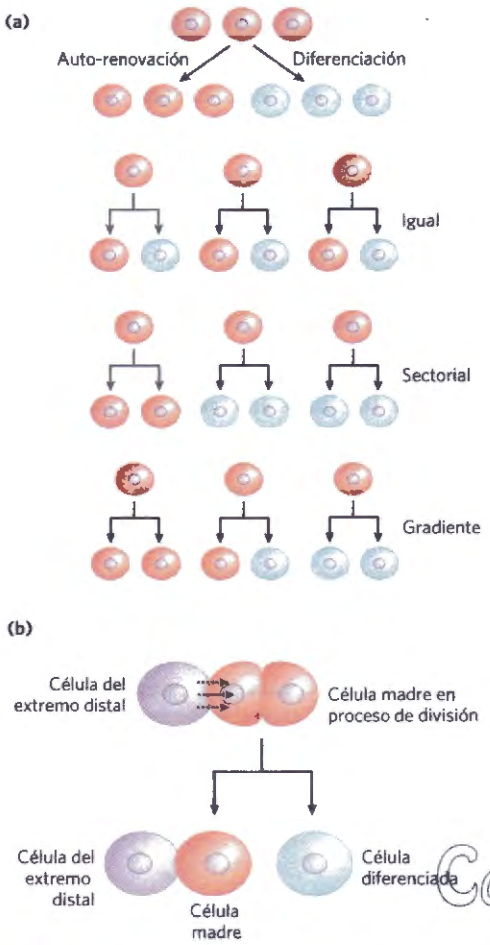


FIGURA 28-45 Proliferación de las células madre frente a la diferenciación y el desarrollo. Las células madre deben mantener el balance entre auto-renovación y diferenciación. **(a)** Algunos patrones posibles de división celular que permiten la renovación de las células madre y la producción de algunas células diferenciadas. Cada célula puede producir una célula madre y una célula diferenciada, o dos células diferenciadas, o dos células madre en determinadas zonas de un tejido o un cultivo. O bien puede establecerse un gradiente de condiciones de crecimiento con un destino celular distinto en un extremo u otro del gradiente. **(b)** Establecimiento de un nicho de desarrollo mediante el contacto de la célula madre con una célula o grupo de células. Las señales moleculares suministradas por las células del nicho (en este caso, para las plantas, una célula del extremo distal) ayudan a orientar el huso mitótico para la división de la célula madre y aseguran que una de las células hijas retiene las propiedades de una célula madre.

sin diferenciación. Las células madre embrionarias de ratón se cultivan sobre una capa de gelatina y requieren la presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF). Las células madre embrionarias humanas se cultivan sobre una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios de ratón y requieren factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF o FGF2). El uso de una capa alimentadora de células significa que las células de ratón suministran un producto que difunde o algún tipo de señal de superficie, todavía no identificados, que son necesarios para que las células madre humanas se dividan o para evitar su diferenciación.

Un avance significativo, publicado en 2007, consistió en revertir la diferenciación. En efecto, se han reprogramado células de la piel, primero de ratones y después en humanos, para que adquieran las características de las células madre pluripotentes. La reprogramación consiste en hacer que las células expresen al menos cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Nanog y Lin28, conocidos todos ellos por contribuir al mantenimiento de las características de las células madre. El perfeccionamiento gradual de esta tecnología puede hacer innecesaria la recolección de células madre embrionarias y suministrar una fuente de células madre genéticamente idénticas a las de un paciente potencial.



James Thomson
[Fuente: Cortesía de James Thomson.]

Nuestra discusión de la regulación del desarrollo nos devuelve al punto de partida bioquímico. La evolución inspira las primeras y las últimas palabras de este libro. Si la evolución consiste en generar el tipo de cambios en un organismo que lo haría una especie diferente, el programa de desarrollo tiene que verse afectado. Los procesos de evolución y desarrollo van de la mano e intercambian información (Recuadro 28-1). El estudio continuado de la bioquímica está directamente implicado en la mejora del futuro de la humanidad y en la comprensión de nuestros orígenes.

RESUMEN 28.3 Regulación de la expresión génica en los eucariotas

COPY-STATION

- En los eucariotas la regulación positiva es más frecuente que la negativa, y la transcripción está acompañada de grandes cambios en la estructura de la cromatina.
- Los promotores de la Pol II tienen, habitualmente, una secuencia TATA y una secuencia Inr, así como múltiples sitios de unión para activadores de la transcripción. Estos últimos sitios, a veces localizados a centenares o a miles de pares de bases de la secuencia TATA, se denominan secuencias activadoras corriente arriba en levaduras y potenciadores en los eucariotas superiores.
- Generalmente, hacen falta grandes complejos proteicos para regular la actividad transcripcional. Los efectos de los activadores de la transcripción sobre Pol II se deben a complejos de proteínas coactivadoras tales como Mediador. Las estructuras modulares de los activadores tienen distintos dominios de activación y de unión al DNA. Otros complejos proteicos, incluidas las histona acetiltransferasas y los complejos dependientes de ATP, tales como SWI/SNF y ISWI, remodelan reversiblemente y modifican la estructura de la cromatina.
- Las hormonas afectan la regulación de la expresión génica de dos maneras distintas. Las hormonas esteroideas interaccionan directamente con receptores intracelulares que son proteínas reguladoras de unión a DNA; la unión de la hormona tiene efectos positivos o negativos en la transcripción de los genes diana. Las hormonas no esteroideas se unen a receptores de superficie celular, activando una vía de señalización que puede producir la fosforilación de una proteína reguladora que afecta su actividad.
- La regulación mediada por ncRNAs juega un importante papel en la expresión génica eucariótica, con la

gama de mecanismos conocidos en expansión para incluir las interacciones con proteínas, mRNA, y otros ncRNAs.

■ Los mecanismos de regulación más complejos se encuentran en el desarrollo de los organismos multicelulares. El destino de las células en el embrión temprano está determinado por el establecimiento de los gradientes antero-posterior y dorso-ventral de las proteínas que actúan como activadores de la transcripción o de represores de la traducción, regulando los genes necesarios para el desarrollo de las estructuras correspondientes a cada parte del organismo. Hay conjuntos de genes reguladores que operan sucesivamente en el tiempo y en el espacio, transformando determinadas áreas de una célula huevo en estructuras predecibles en el organismo adulto.

■ La diferenciación de las células madre para dar tejidos funcionales puede controlarse por señales y condiciones extracelulares.

Términos clave

Todos los términos en negrita están definidos en el glosario.

genes constitutivos 1120
inducción 1120
represión 1120
factor
de especificidad 1121
represor 1121
activador 1121
RNA largo no codificante (lncRNA) 1121
operador 1121
regulación negativa 1122
regulación positiva 1122
regulador
arquitectónico 1123
operón 1123
hélice-giro-hélice 1126
dedo de zinc 1127
homeodominio 1127
homeosecuencia 1127
motivo de reconocimiento de RNA (RRM) 1127
cremallera de leucina 1128
hélice-lazo-hélice básico 1128
control combinatorio 1129
proteína receptora de cAMP (CRP) 1130
regulón 1131
atenuación de la transcripción 1132
represor traduccional 1135
respuesta severa 1135
ribointerruptor 1137
variación de fase 1138
remodelación de la cromatina 1140
SWI/SNF 1140
ISWI 1140
CHD 1140
INO80 1140
histona acetiltransferasas (HAT) 1140
potenciadores 1142
secuencias activadoras corriente arriba (UAS) 1142
activadores de la transcripción 1142
coactivadores 1142
factores de transcripción basal 1142
grupo de alta movilidad (HMG) 1144
Mediador 1144
complejo de preinicio (PIC) 1144
proteína de unión a TATA (TBP) 1144
elementos de respuesta hormonal (HRE) 1147
RNA de interferencia (RNAi) 1150
ncRNA 1151
polaridad 1152
metamerismo 1152
genes maternos 1152
mRNA maternos 1152
genes de segmentación 1152
genes gap 1153
genes de la regla par 1153
genes de la polaridad de los segmentos 1153
genes homeóticos 1155
genes *Hox* 1155
totipotente 1157
pluripotente 1157
unipotente 1157
células madre embrionarias 1157

Problemas

1. Efecto de la estabilidad del mRNA y de la proteína en la regulación Se hacen crecer células *E.coli* en un medio con glucosa como única fuente de carbono. Se añade triptófano en un momento dado. Las células continúan creciendo y se dividen cada 30 min. Describa (cualitativamente) cómo cambia la actividad triptófano sintasa en las células bajo las siguientes condiciones:

(a) El *trp* mRNA es estable (degradándose lentamente durante muchas horas).

(b) El *trp* mRNA se degrada rápidamente, pero la triptófano sintasa es estable.

(c) El *trp* mRNA y la triptófano sintasa son ambos degradados más rápidamente de lo normal.

2. El operón lactosa Se construye un operón *lac* en un plásmido, pero se inactivan todas las partes del operador *lac* (*lacO*) y el promotor *lac*, que son sustituidos por el sitio de unión del represor LexA (que actúa en la respuesta SOS) y un promotor regulado por LexA. El plásmido se introduce en células de *E. coli*, cuyo operón *lac* contiene un gen *lacZ* inactivo ¿En qué condiciones estas células transformadas producirán β-galactosidasa?

3. Regulación negativa Describa los efectos probables de la expresión génica en el operón *lac* de una mutación en (a) el operador *lac* que elimina la mayor parte de O_1; (b) el gen *lacI* que inactiva el represor; (c) el promotor que altera la región en torno a la posición –10.

4. Unión específica al DNA por proteínas reguladoras Una proteína represora bacteriana típica discrimina entre su sitio específico de unión al DNA (operador) y el DNA no específico con un factor de 10^4 a 10^6. Unas diez moléculas de represor por célula son suficientes para asegurar un elevado nivel de represión. Suponga que un represor muy similar existiese en una célula humana, con una especificidad similar para su sitio de unión. ¿Cuántas copias del represor se requerirían para obtener un nivel de represión similar al de la célula bacteriana? (Sugerencia: El genoma de *E. coli* contiene unos 4,6 millones de pb; el genoma haploide humano tiene unos 3.200 millones de pb).

5. Concentración del represor en *E. coli* La constante de disociación de un complejo represor-operador determinado es muy baja, alrededor de 10^{-13} M. Una célula de *E. coli* (volumen 2×10^{-12} mL) contiene 10 copias del represor. Calcule la concentración celular de la proteína represora. ¿Qué relación guarda este valor con la constante de disociación del complejo represor-operador? ¿Cuál es el significado de este resultado?

6. Represión por catabolito Se hacen crecer células de *E. coli* en un medio que contiene lactosa, pero sin glucosa. Indique si cada uno de los siguientes cambios o condiciones aumentaría, disminuiría o no cambiaría la expresión del operón *lac*. Puede ayudarle dibujar un modelo que refleje qué está sucediendo en cada situación.

(a) Adición de una elevada concentración de glucosa.

(b) Una mutación que impida la disociación del represor Lac del operador.

(c) Una mutación que inactive completamente la β-galactosidasa.

(d) Una mutación que inactive completamente la galactósido permeasa.

(e) Una mutación que impida la unión de la CRP a su sitio de unión cerca del promotor *lac*.

COPY-STATION

7. Atenuación de la transcripción ¿Qué efectos tendrían las siguientes manipulaciones de la región guía del *trp* mRNA sobre la transcripción del operón *trp* de *E. coli*?

(a) Aumento de la distancia (número de bases) entre el gen del péptido guía y la secuencia 2

(b) Aumento de la distancia entre las secuencias 2 y 3

(c) Eliminación de la secuencia 4

(d) Cambio de los dos codones de Trp en el gen del péptido guía por codones de His

(e) Eliminación del sitio de unión al ribosoma del gen que codifica el péptido guía

(f) Cambio de varios nucleótidos en la secuencia 3 de manera que pueda aparearse con la secuencia 4 pero no con la secuencia 2

8. Represores y represión ¿De qué modo se vería afectada la respuesta SOS de *E. coli* por una mutación en el gen *lexA* que impidiese la hidrólisis autocatalítica de la proteína LexA?

9. Regulación por recombinación En el sistema de variación de fase de *Salmonella*, ¿qué efecto tendría sobre la célula que la recombinasa Hin se hiciese más activa y promoviese la recombinación (inversión del DNA) varias veces en cada generación celular?

10. Inicio de la transcripción en eucariotas Se descubre una nueva actividad RNA polimerasa en extractos crudos de células procedentes de un hongo exótico. La RNA polimerasa inicia la transcripción solamente a partir de un único promotor altamente especializado. A medida que progresa la purificación de la polimerasa su actividad se reduce y el enzima purificado es completamente inactivo a menos que se añada extracto crudo a la mezcla de reacción. Sugiera una explicación para estas observaciones.

11. Dominios funcionales en proteínas reguladoras Se reemplaza el dominio de unión al DNA de la proteína Gal4 de levadura con el dominio de unión al DNA del represor Lac y se encuentra que la proteína modificada ya no regula la transcripción de los genes *GAL* de levadura. Dibuje un diagrama de los diferentes dominios funcionales que esperaría encontrar en la proteína Gal4 y en la proteína modificada. ¿Por qué la proteína modificada ya no regula la transcripción de los genes *GAL*? ¿Qué podría hacerse en el sitio de unión al DNA reconocido por esta proteína quimérica para hacerla funcional en la activación de la transcripción de los genes *GAL*?

12. Modificación de los nucleosomas durante la activación de la transcripción Para preparar una región genómica para la transcripción, ciertas histonas de sus nucleosomas se acetilan y metilan en sitios específicos. Cuando cesa la transcripción, estas modificaciones tienen que revertirse. En los mamíferos, la metilación de los residuos Arg de las histonas se revierte por peptidilarginina desiminasas (PADI). La reacción promovida por estos enzimas no genera arginina no metilada. En su lugar, se generan residuos de citrulina en la histona. ¿Cuál es el otro producto de la reacción? Sugiera un mecanismo para esta reacción.

13. Represión génica en Eucariotas Explique por qué la represión génica en Eucariotas por un RNA sería más eficiente que la represión por una proteína represora.

14. Mecanismos de la herencia en el desarrollo Un huevo de *Drosophila* que sea *bcd*$^-$/*bcd*$^-$ puede desarrollarse de forma normal pero la mosca del vinagre adulta no será capaz de producir descendencia viable. Explíquelo.

Problema de análisis de datos

15. Diseño de un conmutador genético en *Escherichia coli* La regulación génica se describe a menudo como un fenómeno de todo o nada: un gen se expresa plenamente o no se expresa en absoluto. De hecho, en la represión y la activación de un gen intervienen interacciones de unión de ligandos que hacen que los genes puedan tener niveles de expresión intermedios cuando los niveles de moléculas reguladoras son intermedios. Por ejemplo, en el operón *lac* de *E. coli*, considere el equilibrio de unión del represor Lac, el DNA operador y el inductor (véase la Fig. 28-8). Aunque este es un proceso cooperativo complejo, puede ser representado aproximadamente por la siguiente reacción (R es el represor; IPTG es el inductor isopropil-β-D-tiogalactósido):

$$R + IPTG \underset{}{\overset{K_d = 10^{-4}\,M}{\rightleftharpoons}} R \bullet IPTG$$

El represor libre, R, se une al operador e impide la transcripción del operón *lac*; el complejo R·IPTG no se une al operador y, por tanto, la transcripción del operón *lac* puede proseguir.

(a) Por medio de la Ecuación 5-8, podemos calcular el nivel de expresión relativo de las proteínas del operón *lac* en función de [IPTG]. A partir de este cálculo, determine en qué intervalo de [IPTG] variaría el nivel de expresión entre el 10% y el 90%.

(b) Describa cualitativamente el nivel de las proteínas del operón *lac* en una célula de *E. coli* antes, durante y después de la inducción con IPTG. No es necesario que calcule las cantidades en momentos exactos, la tendencia general es suficiente.

Copy-station

Gardner, Cantor y Collins (2000) se propusieron construir un "conmutador genético", un sistema de regulación génica con las dos características clave, A y B, de un interruptor de luz. (A) *Tiene sólo dos estados*: está completamente encendido o completamente apagado; no es un interruptor gradual. En términos bioquímicos, el gen diana del sistema genético (operón) se expresa plenamente o no se expresa en absoluto; no puede expresarse a nivel intermedio. (B) *Ambos estados son estables*: aunque es necesario usar un dedo para mover el interruptor de un estado a otro, una vez realizada la operación y retirado el dedo, el interruptor permanece en el estado seleccionado. En términos bioquímicos, la exposición a un inductor o a alguna otra señal cambia el estado de expresión del gen o del operón, que permanece en este estado una vez se ha eliminado la señal.

(c) Explique por qué el operón *lac* carece de las características A y B.

Para construir su "conmutador" Gardner y colaboradores diseñaron un plásmido con los siguientes componentes:

ori Un origen de replicación

amp^R Un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina

OP_{lac} La región promotora del operador del operón *lac* de *E. coli*

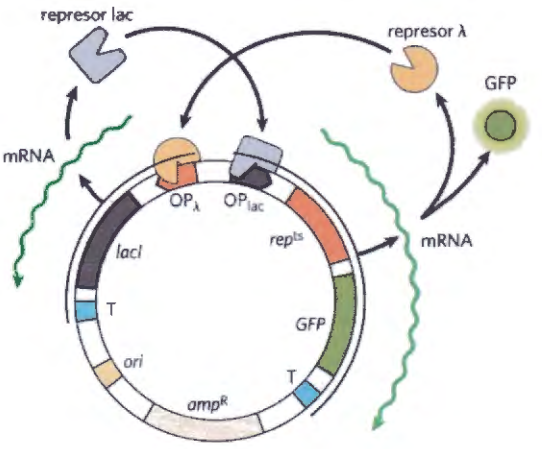
OP_λ La región promotora del operador del fago λ

lacI El gen que codifica la proteína represora de *lac*, LacI. En ausencia de IPTG, esta proteína reprime fuertemente a OP_{lac}; en presencia de IPTG, permite la expresión plena a partir de OP_{lac}

rep^{ts} El gen que codifica un mutante sensible a temperatura de la proteína represora de λ, *rep*^{ts}. A 37 °C esta proteína reprime fuertemente a OP_λ; a 42 °C permite la expresión plena de OP_λ.

GFP El gen de la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína reportera altamente fluorescente (véase la Fig. 9-16).
T Terminador de la transcripción

Estos componentes se dispusieron de tal modo (véase la figura a continuación) que los dos promotores se reprimiesen recíprocamente: OP_{lac} controlaba la expresión de rep^{ts} y OP_{λ} controlaba la expresión de *lacI*. El estado del sistema se siguió a través del nivel de expresión de *GFP*, que también se encontraba bajo control de OP_{lac}.



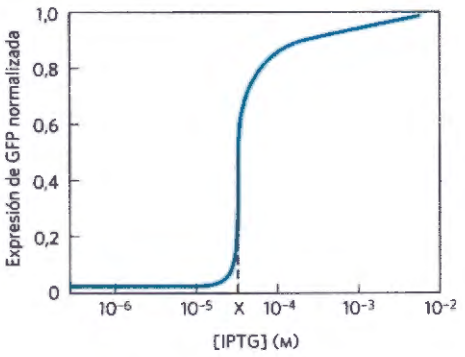
(d) El sistema tiene dos estados: GFP conectado (nivel de expresión elevado) y GFP desconectado (nivel de expresión bajo). Para cada estado, describa qué proteínas están presentes y qué promotores se están expresando.

(e) Esperaríamos que el tratamiento con IPTG conmutara el sistema de un estado a otro. ¿De cuál a cuál? Explique su razonamiento.

(f) Esperaríamos que el tratamiento con calor (42 °C) conmutara el sistema de un estado a otro. ¿De cuál a cuál? Explique su razonamiento.

(g) ¿Por qué esperaríamos que este plásmido tuviese las características A y B descritas anteriormente?

Para confirmar que su construcción efectivamente poseía estas características, Gardner y colaboradores mostraron primero que, una vez conectado, el nivel de expresión de GFP (alto o bajo) se mantenía estable por largos períodos de tiempo (característica B). A continuación, midieron el nivel de GFP a diferentes concentraciones del inductor IPTG, con los siguientes resultados.



1 Expresión de GFP normalizada

Observaron que nivel promedio de expresión de GFP era intermedio a una concentración X de IPTG. Sin embargo, cuando midieron el nivel de expresión de GFP en *células individuales* a [IPTG] = X encontraron un nivel alto o un nivel bajo de GFP; ninguna célula mostró un nivel intermedio.

(h) Explique por qué este hallazgo demuestra que el sistema tiene la característica A. ¿Qué provoca la expresión bimodal de los niveles de expresión a [IPTG] = X?

COPYSTATION

Referencia

Gardner, T.S., C.R. Cantor, and J.J. Collins. 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403:339–342.

Bibliografía complementaria en: www.macmillanlearning.com/LehningerBiochemistry7e

Leyenda:
f = figuras; r = material en recuadros;
s = fórmulas estructurales; t = tablas;
las cifras en **negrita** se refieren a los términos destacados en negrita en el texto.

A

A Véase absorbancia
A Véase adenina
AAA + ATPasa, **989**, 993
AAT. *Véase* aspartato aminotranferasa
abrazadera deslizante *β*, 987, 992*f*, 993
absorbancia (*A*), **80r**
absorción, de grasas de la dieta, 648-649, 648*f*, 649*f*
ACAT. *Véase* acil-CoA-colesterol acil transferasa
ACC. *Véase* acetil-CoA carboxilasa
aceites para cocinar, hidrogenación parcial de, 363, 363*f*
aceptores electrónicos universales, convergencia de electrones de la cadena respiratoria a, 708-710, 710*t*
acetil-CoA acetil transferasa, **832**, 832*f*
acetil-CoA carboxilasa (ACC), **805**
en regulación de la oxidación de ácidos grasos, 659, 659*f*, 662
formación de malonil-CoA por, 806-806, 806*f*
regulación de, 812-814, 813*f*
acetil-CoA. *Véase* acetil-coenzima A
acetil-coenzima A l(acetil-CoA), 15*f*, 15*s*
a partir de cuerpos cetónicos, 666-668, 667*f*, 668*f*
degradación de aminoácidos a, 688*f*, 694, 695*f*, 696*f*
en el ciclo del glioxilato, 794-796, 795*f*
en hígado, 912-914, 913*f*, 914*f*
en la síntesis de ácidos grasos, 808, 809-811, 809*f*, 810*f*
lanzadera de, 812, 813*f*
en la síntesis de colesterol, 831-834, 831*f*, 834*f*, 835*f*
energía libre de hidrólisis de, 509-510, 511*f*, 511*t*
formación de malonil-CoA a partir de, 805-806, 806*f*
oxidación de ácidos grasos a. *Véase* oxidación de ácidos grasos
oxidación de piruvato a, 617
canalización de sustratos en el complejo PDH, 621, 621*f*
coenzimas del complejo PDH, 619, 619*f*, 620*f*
enzimas del complejo PDH, 619-620, 620*f*
reacción de descarboxilación oxidativa, 618-619, 619*f*
regulación alostérica y covalente de, 637-638, 638*f*
oxidación de. *Véase* ciclo del ácido cítrico
regulación de la piruvato quinasa por, 592-593, 593*f*
acetilación, 230, 321*f*
de histonas, 1140-1141, 1141*t*
acetilcolina, 428*s*
en señalización neuronal, 471, 472*f*
acetoacetato, **666**, 666*s*
en diabetes mellitus, 930
formación y uso del, 666-668, 667*f*, 668*f*
acetoacetato descarboxilasa, **667**, 667*f*
acetoacetil-ACP, 809*f*, 809
acetona, **666**, 666*s*
en diabetes mellitus, 930
formación y uso de la, 666-668, 667*f*, 668*f*
aciclovir, 996, 996*s*
acidemia argininosuccínica, 694*t*
acidemia metilmalónica (MMA), 694*t*, 698-700, 700*r*-701*r*
ácido araquídico, estructura y propiedades de, 360*t*
ácido araquidónico
estructura y propiedades de, 360*t*
icosanoides derivados de, 373-374, 373*f*
ácido ascórbico. *Véase* vitamina C
ácido carbónico, como tampón. Véase sistema tampón de
ácido clavulánico, 225-227, 227*f*
ácido desoxirribonucleico (DNA), 15, **30**, **279**
absorción de la luz UV por, 296
amplificación de,
con vectores de clonación, 324-327, 324*f*, 325*f*, 326*f*, 327*f*
PCR, 301-303, 303*f*, 306*r*-307*r*, 333, 333*f*
bases nitrogenadas del. Véase bases nitrogenadas
cartografiado de desnaturalización, 982
circular cerrado, 958 clonado de. *Véase* clonado de DNA
cloroplasto, 953
complementario, 336, 335*f*, 336, 337*f*, 1056-1057
continuidad genética y, 30-31
cruciforme, 961, 961*f*
dañado. *Véase* reparación del DNA; mutaciones
degradación de, 983
desnaturalización y sellado de, 295-298, 297*f*
empaquetamiento cromosómico de. *Véase* cromosomas
en bacterias, 953, 954*f*, 954*t*
en eucariotas, 953-956, 954*t*, 955*f*
en virus, 951-952, 951*f*, 953*t*, 996
enlaces fosfodiéster en, 284-286, 285*f*
estructura del, 31, 31*f*
desenrollamiento de, 982, 982*f*
doble hélice, 287-289, 288*f*, 289*f*
efectos de las bases de los nucleótidos sobre, 286-287, 286*f*, 287*f*
inusuales, 291-293, 291*f*, 292*f*
variación en, 290-291, 290*f*
estudio de. *Véase* genómica
hebra no molde del, 1029, 1029*f*
huella sobre, 1032*r*
metilación de, 300-301
mitocondrial, 955*f*, 953
mutación de. *Véase* mutaciones
no codificante, 1346
proteínas codificadas por, 31-32, 32*f*
punto de fusión del, 297
recombinación específica de sitio, 1005
recombinante. *Véase* DNA recombinante
relajado, 957, 958*f*
rotación de la hebra, 1029
rotura de doble cadena en, 1005-1015, 1008*f*
satélite, 956
secuenciación de
método de Sanger para, 303-305, 304*f*, 305*f*
tecnologías para la, 305-311, 308*f*, 309*f*, 310*f*
síntesis química de, 302*f*, 301
superenrollamiento de, 958-959, 959*f*
números de enlace que miden, 959-961, 960*f*, 961*f*
topoisomerasas que modifican, 961-963, 962*f*, 963*f*, 963*t*, 964*r*-965*r*
superenrollamiento del, 957, 957*f*, 958*f*
números de enlace que describen, 959-961, 960*f*, 961*f*
plectonémico y solenoidal, 964, 965*f*, 965*f*
replicación y transcripción y, 967, 958*f*
topoisomerasas que modifican, 961-963, 962*f*, 963*f*, 963*t*, 964*r*-965*r*
superenrollamiento de, 958-961, 959*f*, 960*f*, 961*f*
transcripción de exones a partir de, 1041
transcripción de intrones a partir de, 1041
transcripción de. *Véase* transcripción
transformaciones no enzimáticas del, 298-300, 298*f*, 299*f*
unión de la RNA polimerasa al, 1120-1121, 1121*f*
uracilo en, 891
ácido docosohaenoico (DHA),
síntesis de, 814*f*, 818
ácido esteárico, estructura y propiedades, 360*t*
ácido fítánico, 663
α oxidación de, 665, 665*f*
ácido fosfatídico fosfatasa, **821**, 821*f*
ácido fosfatídico, 368*f*, **821**
glicerofosfolípidos como derivados de, 365-366, 365*f*, 366*f*
síntesis de, 820-821, 821*f*, 824-825, 825*f*
ácido galacturónico, 249
ácido glucónico, 249
ácido glucurónico, 249
ácido hexacosanoico, 663
ácido icosapentaenoico (EPA), 361, **818**
síntesis de, 818
ácido láurico, estructura y propiedades, 360*t*, 361
ácido lignocérico, estructura y propiedades, 360*t*
ácido linoleico, estructura y propiedades de, 360*t*
ácido manurónico, 249
ácido mirístico, estructura y propiedades de, 360*t*
ácido *N*-acetilmurámico, 259-260, 260*f*
ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) 249, 249*f*, 270
en ganglósidos, 368
ácido nalidíxico, 964*r*
ácido nicotínico. *Véase* niacina
ácido nitroso, daño al DNA causado por, 299-300, 300*f*
ácido oleico, estructura y propiedades, 360*t*
ácido palmítico, estructura y propiedades de, 360*t*
ácido palmitoleico, estructura y propiedades de, 360*t*
ácido pristánico, 662
ácido retinoico (RA), 375-377, 376*f*, 377*f*, 906
ácido ribonucleico (RNA), **281**
bases nitrogenadas. *Véase* bases nitrogenadas
corte y empalme de intrones por, 1041-1045, 1041*f*, 1042*f*, 1043*f*, 1044*f*
de transferencia. *Véase* RNA de transferencia
degradación de, 1040
desnaturalización de, 296-298, 297*f*
elongación de, 1038
enlaces fosfodiéster en, 284-286, 285*f*
estructura de,
de cadena sencilla, 293, 294*f*
efectos de las bases nucleotídicas sobre, 286, 286*f*, 287*f*
mRNA, 293, 294*f*
rRNA, 293-295, 294*f*, 296*f*, 1081-1084, 1082*t*, 1091*f*
tRNA, 293-295, 294*f*, 296*f*, 1084, 1084*f*, 1085*f*
fuente de, 1027
función especial, 1027-1028
hidrólisis de, 285, 285*f* lncRNA, 1121, 1148, 1151
mensajero. *Véase* RNA mensajeros
miRNA, 1150-1151, 1151*f*
no codificante, 1151
nuclear pequeño, 1042
procesamiento de. *Véase* procesamiento de RNA
regulación del inicio de la transcripción por, 1121-1123, 1121*f*, 1122*f*
regulación génica por, 1149-1151, 1151*f*
ribosómico. *Véase* RNA ribosómico
síntesis de. *Véase* transcripción
siRNA, 1151, 1151*f* sRNA, 1136-1138, 1136, 1137*f*
tipos de, 281
velocidad de recambio de, 1040
ácido taurocólico, 372
ácido úrico
catabolismo de nucleótidos que produce, 891-894, 892*f*, 893*f*
de la degradación de purinas, 891-892, 892*f*, 893*f*
ácido urónico, **249**
ácido α-linolénico (ALA)
ácidos grasos omega-3 sintetizados a partir de, 361
estructura y propiedades de, 360*t*
ácido γ-aminobutírico (GABA), **880**
biosíntesis de, 880-882, 881*f*
receptores del, 430, 472-473
ácidos aldónicos, **249**
ácidos
aminoácidos como, 81-85, 83*f*, 84*f*, 85*f*
como tampones, 63-67, 64*f*, 65*f*, 66*f* ionización de agua pura, 58-59, 59*f* constantes de disociación ácida y, 61-62, 61*f*
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de titulación y, 62-63, 62*f*, 63*f*
escala de pH y, 60-61, 60*f*, 60*t*
ácidos biliares, **372**, 648-649, 648*f*, **834**
síntesis de, 834, 835*f*
ácidos débiles
como tampones, 63-67, 64*f*, 65*f*, 66*f*

Certification

ionización de,
agua pura, 58-59, 59f
constantes de equilibrio y, 59-60
constantes de ionización ácida y, 61-62, 61f
curvas de valoración y, 62-63, 62f, 63f
escala de pH y, 60-61, 60f, 60t
pK_a de, 62-63, 62f, 63f
ácidos grasos esenciales, **815**
ácidos grasos insaturados
dobles enlaces en, 360-361
estructura y propiedades de, 360t, 361, 361f
hidrogenación parcial de, 363, 363f
PUFA. *Véase* ácidos grasos poliinsaturados
síntesis de, 814f, 815, 815f, 816r-817r, 818
β oxidación de, 657-658, 657f, 658f
ácidos grasos libres (FFA), **649**
ácidos grasos monoinsaturados,
β-oxidación de, 657, 657f
dobles enlaces en, 360
ácidos grasos omega-3 (ω-3), **361**
en enfermedad cardiovascular, 361
síntesis de icosanoides a partir de, 818-820, 818f, 819f
síntesis de, 814-815, 814f, 815f, 818
ácidos grasos omega-6 (ω-6), **631**
en enfermedad cardiovascular, 361
síntesis de icosanoides a partir de, 818-820, 818f, 819f
síntesis de, 814-815, 814f, 815f
ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), **361**
dobles enlaces en, 360-361
en enfermedad cardiovascular, 361
nomenclatura de, 361
síntesis de icosanoides a partir de, 818-820, 818f, 819f
síntesis de, 814f, 815, 815f, 816r-817r, 818
β oxidación de, 657-658, 657f, 658f
ácidos grasos saturados
estructura y propiedades de, 360t, 361, 361f
síntesis de,
de cadena larga, 814, 814f
de palmitato, 808f, 810-811, 810f
desaturación después de, 815, 815f, 816r-817r, 818
en cloroplastos, 811-812, 811f, 812f
en el citosol, 811, 811f, 812f
formación de malonil-CoA para, 805-806, 806f
lanzadera de grupos acetilo para, 811-812, 813f
Reacciones en el ácido graso sintasa 806, 807, 808
regulación de, 812-814, 813f
secuencia repetida de reacciones para, 806, 807f, 808, 808f, 809f, 810-811, 810f
sitios activos de la ácido graso sintasa para, 808, 808f
β oxidación de
cuatro pasos básicos de, 653-654, 653f, 655f
hibernación mantenida energéticamente por, 656r
oxidación de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico, 655-657, 657t
repetición de pasos para producir acetil-CoA y ATP, 654-655, 656r
ácidos grasos trans, 360
efectos dañinos sobre la salud, 363, 363f
ácidos grasos, **359**
activación de, 650-652, 651f, 652f
como lípidos de almacenamiento, 364f-365f
ceras, 363-364, 364f
como derivados hidrocarbonados, 359-362, 360t, 361f
triacilgliceroles, 362-363, 362f, 363f
con enlace éter, 366-367, 827-828, 830f
cuerpos cetónicos a partir de, 666-668, 667f, 668f
digestión de, 648-649, 648f, 649f
dobles enlaces en, 359-361
en el hígado, 913, 914f
en glicerofosfolípidos, 365-366
esenciales, 815
estructura y propiedades de, 360t, 361, 361f
gluconeogénesis y, 561
hidrogenación parcial de, 363, 363f
movilización de, 649-650, 650f, 651f
nomenclatura de, 369, 360t, 361
regulación de la piruvato quinasa por, 593-594, 593f
transporte de, 650-652, 651f, 652f
ácidos nucleicos, 10f, **15**
bases de, 281-284, 282f, 282t, 281f, 282f
apareamiento de. *Véase* pares de bases
enlaces fosfodiéster en, 284-286
estructura tridimensional de
doble hélice del DNA, 287-289, 288f, 289f, 230f
efectos de las bases de los nucleótidos en, 286-287, 286f 287f
estructuras no usuales adoptadas por secuencias de DNA, 291-293, 290f, 291f, 292f
mRNA, 293, 293f
rRNA, 293-295, 294f, 286f, 1081-1083, 1082t, 1083f
tRNA, 293-295, 294f, 296f, 1083, 1084f, 1085f
variación en el DNA de la, 290-291, 290f
nomenclatura, 282t, 284
pentosas en, 244, 244f, 281-284, 282f, 282t, 283f, 284f
química de,
amplificación del DNA, 301-303, 303f, 306r-307r
desnaturalización, 295-298, 297f
metilación del DNA, 300-301
secuenciación del DNA, 303-311, 304f, 305f, 308f, 309f, 310f
síntesis química del DNA, 302f, 301
transformaciones no enzimáticas, 298-300, 298f, 299f, 300f
tipos de, 281
ácidos siálicos, 249, 249f. *Véase* también ácido *N*-acetilneuramínico
acidosis metabólica, metabolismo de la glutamina y, 678-680
acil fosfato, **540**
acil graso-carnitina, 651
acil graso-CoA desaturasa, **815**, 815f
acil graso-CoA deshidrogenasa, 653f, **653**
defectos genéticos en, 662
acil graso-CoA, **650**
en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, 820, 821f
formación de, 513, 650-651, 651f
transporte de, 650-652, 652f
acil-CoA acetiltransferasa, **654**
en formación de cuerpos cetónicos, 666-667, 667f
en oxidación de ácidos grasos, 653f, 654
acil-CoA de cadena corta deshidrogenasa, 654
acil-CoA de cadena media deshidrogenasa (MCAD), 654, **662**
defectos genéticos en, 662
acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa (VLCAD), 654
acil-CoA deshidrogenasa, 653f, **654**, **719**
defectos genéticos en, 662
transferencia electrónica por, 719, 719f
acil-CoA sintetasas, **650**
en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, 820, 821f
acil-CoA-colesterol acil transferasa (ACAT), **836**, 836f
acilación, en el mecanismo de la quimotripsina, 216-220, 216f, 217f, 218f-219f
acivicina, **894**, 894f
AcMNPV. *Véase* nucleopolihedrovirus multicápsida de *Autographa*
aconitasa, **625**, 626r-627r, 627f
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 625, 626r-627r, 627f
aconitato hidratasa, **625**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 625, 626r-627r, 627f
acoplamiento energético, 24-25, 25f
estequiometrías no integrales de consumo de O_2 y síntesis de ATP en, 733-735
oxidación y fosforilación, 724-727, 726f, 727f
pasos 6 y 7 en la glucólisis, 543
ACP. *Véase* proteína portadora de acilos
acridina, **1088**, 1039f
ACTH: *Véase* hormona adrenocorticotropa
actina, 7, 9f, 180f, **181**
interacciones de la miosina del filamento grueso con, 182f, 183, 183f
α-actinina, **182**
actinomicina D, **1088**, 1039f
activadores de la transcripción, **1142**
estructura modular de, 1145-1146, 1147f
unión al DNA, en el ensamblaje de factores de transcripción, 1142-1145, 1143f,1145f
activadores de unión al DNA, en el ensamblaje del factor de transcripción, 1142-1145, 1143f, 1145f
activadores, **1121**, 1122, 1122f
estructura modular de, 1146-1147, 1147f
unión al DNA, en el ensamblaje del factor de transcripción, 1142-1145, 1143f, 1145f
actividad enzimática. *Véase* actividad
actividad específica, **94**
en los enzimas, 94-95, 96f
actividad exonucleasa 3'⟶5', en las DNA polimerasas 984-985, 986f
actividad exonucleasa 5'⟶3', en DNA polimerasas, 986f, 987
actividad óptica, **18r**, 76
de aminoácidos, 76
actividad, **94**
de enzimas, 94-95, 96f
efectos de flujo de, 582, 583, 583f, 584r-585r
regulación de, 575.578, 576f, 576t, 577f, 578f, 578t
Actos. *Véase* pioglitazona
acuaporinas (AQP), **423**
en la diabetes insípida, 411r
paso del agua a través, 423-425, 423t, 424f
ADA. *Véase* adenosina desaminasa
ADAR. *Véase* adenosina desaminas que actúan sobre RNA
adenil ciclasa, **441**
en la señalización de GPCR
sistema β-adrenérgico, 441, 445, 445f, 447f
otras molécula reguladoras que la utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
en la movilización de triacilgliceroles, 649-650, 650f
adenilato (AMP), 283s, 514
biosíntesis de, 883-885, 883f, 884f, 885f
degradación de, 891-892, 892f, 893f
en regulación metabólica, 580-581, 580f, 581f, 581t
regulación de PFK-1 y FBPasa-1 por, 590-591, 590f
adenilato quinasa, **515**, **580**, **887**
adenililación, 231f, **613**
en reacciones con ATP, 513-514, 513f, 515r
adenililtransferasa, **662**, 862f
adenina (A), **282**, 282s, 282t
apareamiento de bases de, 286, 287f
biosíntesis de, 883-885, 883f, 884f, 885f
desaminación de, 298f, 299
degradación de, 891-894, 892f, 893f
metilación de, 300-301
origen de, 1062, 1062f
adenina nucleótido translocasa, **734**, 734f, 735
adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, **313**
como molécula reguladora, 313, 313f
como segundo mensajero
para receptores β-adrenérgicos, 441-446, 441f, 442r-444r, 445f, 446f, 447f, 447t
en interacciones con Ca^{2+}, 453-454
otras moléculas reguladoras que utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
eliminación de, 445f, 448
en la movilización de triacilgliceroles, 649, 650f
en la acción de la adrenalina y el glucagón, 604, 605f
estudios FRET de, 452r-453r
adenosina desaminasa (ADA), **891**, 892
adenosina desaminasas que actúan sobre RNA (ADAR), **1078**, 1078f, 107
deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), **891**, 892
adenosina difosfato (ADP)
como molécula señalizadora, 313-314
en la regulación coordinada de las rutas de respiración celular, 739, 739f
en la regulación metabólica, 580-582, 580f, 581f, 581t
en la ruta glucolítica, 536f, 541-544
regulación de la fosforilación oxidativa por, 737, 739, 739f
regulación de PFK-1 y FBPasa-1 por, 590-591, 590f
síntesis de ATP a partir de, 514
adenosina fosforribosiltransferasa, **892**
adenosina trifosfato (ATP)
a partir de la β-oxidación de ácidos grasos, 654-655, 656r, 657t
en el cerebro, 920-921, 920f
en el ciclo de Calvin
necesidades de, 779-781, 783f
fuente de, 783-785, 784f
en el metabolismo celular, 28f, 29
como transportador de energía química, 311-312, 311f

Preservation

a partir de la fosforilación oxidativa, 707-708, 707f, 723
transporte activa
como molécula señalizadora, 313-314
en contracciones del músculo esquelético, 182f, 183, 183f
en el inicio de la replicación, 990
en la fijación de nitrógeno, 858-859
en la reacción de la succinil-CoA sintetasa 623f, 628-630, 629r, 630f
en la regulación coordinada de las rutas de respiración celular, 739, 739f
en la regulación del colesterol, 841-842, 841f
en la regulación metabólica, 580-582, 580f, 581f, 581t
en la ruta glucolítica
acoplamiento de, 537
ganancia neta de, 544
fase de beneficios de, 535f, 536, 536f, 540-544, 542f, 543f
fase preparatoria de, 534-536, 535f, 536f, 538-540, 539f, 541f, 542f
en la síntesis de ácidos grasos, 811-812
energía a partir de, 24, 24f
espliceosoma y, 1042-1043
adenosina, 283s
en cofactores enzimáticos, 312f, 313
ADH, *Véase* hormona antidiurética
adhesión superficial, proteínas integrales de membrana implicadas, 405
adipocitos beige, **916**
adipocitos, **914**
acuaporinas en, **424-425**
beige, 916
blancos, 914-915, 915f
marrones, 740, 740f, 915-916, 915f, 916
movilización de triacilgliceroles fuera de, 649-650, 650f, 651f
triacilgliceroles en, 362-363, 362f
adipogénesis, influencia microbiana del intestino sobre, 940, 940f
adiponectina, **909**, 909f, 910t, **935**
acciones de sensibilidad a la insulina de, 935, 935f
adipoquinas, **908**, 909, 909f, 910t, 931
producción por el tejido adiposo de, 931-933, 932f
Adler, Julius, 474
adoMet. *Véase S*-adenosilmetionina,
ADP-glucosa pirofosforilasa, **794**, 795f
ADP-glucosa, **792**
ADP-ribosilación, 230, 231f
ADP. *Véase* adenosina difosfato
adrenalina (epinefrina), 441s, **880**, **904**
amplificación de la señalización por, 902
biosíntesis de, 880-882, 881f
células que responden a, 437
en la regulación global del metabolismo glucídico, 609-611, 610f, 611f
interacciones de la insulina con, **464**, 465f
movilización de triacilgliceroles por, 649-650, 650f
regulación de la glucógeno fosforilasa por, 605-607, 605f, 606
regulación de la síntesis de triacilgliceroles por, 821-822
regulación del metabolismo energético por, 929, 929f
respuesta al receptor β-adrenérgico
cAMP como segundo mensjero en, 441-446,441f, 442r-444r, 445f, 447f, 447t
desensibilización de, 448-449, 448f, 449f
finalización de la respuesta por, 446-448
adrenoleucodistrofia ligada a X (XALD), **663**
Adriamicina. *Véase* doxorrubicina
afinidad electrónica, potenciales de reducción como medida de, 519-521, 519f, 521t
afinidad, **436**
de transducción de señal, 438, 438f
AFM. *Véase* microscopia de fuerza atómica,
agar, **260**
agarosa, **260**, 260f, 262t
AGE. *Véase* productos finales de glicación avanzada
agentes alquilantes, 299-300, 300f
agentes reductores,
disacáridos como, 252-253
monosacáridos como, 250r-251r, 251-252
agonistas, **441**
de receptores β-adrenérgicos, 441, 441f, 449
Agre, Peter, 423
agrecanos, 266-267, 267f
agregado P, **855**
agregados de proteoglucanos, **266**, 267, 267f
agua
adaptaciones de los organismos vivos a, 69
como dador electrónico, 753-754
como disolvente. *Véase* soluciones acuosas
como reactivo, 69, 69f
complejo de liberación de oxígeno y, 768-769, 769f
compuestos apolares en, 51-54, 52f, 53f, 54t
en la fotosíntesis, 752
enlaces de hidrógeno de, 47-50, 48f, 48t, 49t, 50f
solutos polares y, 49-50, 49f, 50f, 54, 54t
estructura de, 47-48, 48f
gases apolares en, 51, 51t
interacciones de van der Waals en, 53-54, 53t, 54t
ionización de
agua pura, 58-59, 59f
constantes de disociación ácida y, 61-62, 61f
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de valoración y, 62-63, 63f
escala de pH y, 60-61, 60f, 60t
macromoléculas en, 54-55, 54t, 55f, 56f
propiedades coligativas de, 55-58, 56f
punto de fusión, punto de ebullición y calor de vaporización, 47-49, 48t
solutos cargados en, interacciones electrostáticas, 50, 50t, 51f, 54, 54t
sustancias cristalinas en, entropía de disolución, 51, 51f
transporte defectuoso de, 411r, 424
transporte por acuaporina de, 411r, 423-425, 423t, 424f
agua metabólica, a partir de la oxidación de ácidos grasos, 655
AID. *Véase* desaminasas inducidas por activación,
AIR carboxilasa, 883, 884f
aislamiento de, por clonado de DNA, 320-321
aislamiento, triacilgliceroles que proporcionan, 362-363, 362f
AKAP. *Véase* proteínas de anclaje de la quinasa A
Akt. *Véase* proteína quinasa B
ALA. *Véase* ácido α-linolénico
alanilglutamilglicilisina, 86s
alanina aminotransferasa (ALT), **681**, 681f
enzimas de color (Color Inset Figure 6), **685f**
alanina, 78f, **79**, 79s, **831**, **867**
biosíntesis de, 867
catabolismo de, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
gluconeogénesis a partir de, 562-563, 563t
metabolismo de, 574, 675f
transporte de amoníaco desde el músculo al hígado, 680, 681f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
alantoína,
Alberts, Alfred, 845r-846r
albinismo, 694t
albúmina sérica, **649**
albúmina, 649
alcalosis, **61**, 68r
alcaptonuria, 694t, 696f, **697**
alcohol deshidrogenasa, **140f**, **553**, **665**
en la fermentación alcohólica, 553, 553f
inhibición competitiva de, 210
alcoholes grasos con unión éter, en la síntesis de plasmalógenos, 827-828, 830f
aldehído deshidrogenasa, **665**
en la ω-oxidación, 664-665, 665f
aldolasa clase I, 536f, 540, 541f
aldolasa, **540**, **779**
en el ciclo de Calvin, 779, 780, 781
en la ruta glucolítica, 536f, 540, 541
inhibición de, 215f
aldosas, **242**, 242f
centros asimétricos de, 244-245, 245f, 246f
aldosterona, 905
como derivado del colesterol, 374, 374f
$\alpha + \beta$, **140**
α/β, **140**
α1-antiproteinasa, 233
aletargamiento, 656r
ALL. *Véase* leucemia linfoblástica aguda,
almacenamiento
de energía,
en ceras, 363-364, 364f
en homopolisacáridos, 256-257, 256f
en triacilgliceroles, 362-363, 362f
de información genética, en el DNA de doble hélice, 287-289, 288f, 289f, 290f
almidón fosforilasa, 560, 550f, 551
almidón sintasa, **792**
almidón, **255**
almacenamiento energético en, 255-257, 256f
biosíntesis de, 792-794, 795f
en amiloplastos, 753-754, 753f, 754f
en las rutas alimentadoras de la glucólisis, fosforólisis de, 549f, 550-551, 550f
hidrólisis de, 549, 549f
estructuras y papel de, 262t
plegamiento de, 258-259, 258f, 259f
producción en los cloroplastos de, 781
alojamiento, 1058, 1060
alopurinol, **883**
para la enfermedad del sueño africana, 895
para la gota, 893, 893f
ALT. *Véase* alanina aminotransferasa
Altman, Sidney, 1052
Amanita phalloides, 1038
α-a, manitina, **1038**
Amaryl. *Véase* glimepirida
ambientes aeróbicos,
respiración en, 617. *Véase* también respiración celular
α-amilasas, 257, **549**
amilina, 149
amilo (1⟶4) a (1⟶6) transglucosilasa, **601**, 603f
amiloide A sérico (SAA), 149
amiloide, 147, **148**-151, 149
en la enfermedad de Alzheimer, mutaciones génicas que afectan, 350-351
amiloidosis sistémica primaria, 147-149
amiloidosis sistémica secundaria, 149
amiloidosis, **147**, 148-151, 149f
amilopectina, 255-257, 256f, 792
amiloplastos, **753**, 753f
amilosa, 255-256, 256f
enlace glucosídico en, 258f
estructura de, 258-259, 258f, 259f
aminas biológicas, descarboxilación de aminoácidos que produce, 880, 881f, 882f
aminoácidos cetogénicos, **688**
aminoácidos de cadena ramificada, degradación de, 688f, 700-702, 701f
aminoácidos esenciales, **686**, 686t, **863**
aminoácidos glucogénicos, 562, **563**, 563t, **688**
aminoácidos no esenciales, **868**
aminoácidos, 75, *Ver también aminoácidos específicos*
abreviaturas de, 75, 77t
activación de, 1080, 1080f, 1081t
aminoacil-tRNA sintetasas en, 1084-1088, 1085t, 1086f, 1087f, 1088f, 1090r-1092r
características estructurales de, 76-78, 76f, 77t, 78f
carga eléctrica de, 84
clasificación de, 79-81, 79f, 80f, 80r, 81f
codones que codifican los, 951-952, 952f, 1070-1071, 1071f
determinación de, 1070-1073, 1071f, 1072t, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
como tampones, 66, 65f, 83-84
curvas de titulación de, 81-83, 83f, 84f, 85f
degradación de las proteínas de la dieta a, 675-677, 676f
designación de los átomos de carbono en, 76-78
en el ciclo del glioxilato, 794-795, 795f
en el código genético, 1090r-1092r
en el hígado, 913-914, 913f
en la catálisis ácido-base general, 199, 199f
en npéptidos, 85-86, 86f
en proteínas, 10f, 15, 78, 85-87, 87t, 88
esenciales, 686, 686t, 863
glucogénicos, 562-563, 563t, 688
inicio de la síntesis de proteínas por, 1088f, 1089-1095, 1093f, 1094f, 1096t
modificaciones postraducción, 1100-1101, 1102f
moléculas derivadas de
no comunes, 81, 82f
no esenciales, 863
pK_a e índice hidropático de, 77t
propiedades ácido-base de, 81-85, 83f, 84f, 85f
utilización por las bacterias de D-, 879 cetogénicos, 688
aminas biológicas, 880, 881f
creatina y glutatión, 878-879, 879f
NO, 880-882, 881f
porfirinas, 875-878, 876f, 877f, 878r
sustancias vegetales, 880, 880f
aminoacil adenilato (aminoacil-AMP), 1085, 1086f
aminoacil-AMP- *Véase* aminoacil adenilato
aminoacil-tRNA sintetasas, **1070**, 1084, 1085t, 1086f, 1087f

corrección de pruebas por, 1085-1087
expansión del código genético y, 1090r-1092r
interacciones del tRNA con, 1087-1088, 1088f, 1089f
δ-aminolevulinato, 876, 876f, 877f
aminoacil-tRNA, **1070**
codones de unión a, 1072, 1072t
en la elongación, 1095-1096, 1095f
estructura de, 1085-1087, 1087f
expansión del código genético y, 1090r-1092r
síntesis de, 1084-1088, 1085f, 1086f, 1087f, 1088f
aminopeptidasa, **676**
aminopterina, **894**
aminotransferasas, **677**
en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato, 677, 677f, 678f, 679f
amital, 715, 715t
amoníaco
asimilación de nitrato que produce, 854, 854f
asimilación por el glutamato y la glutamina de, 860-861
fijación de nitrógeno a, 854-855
liberación de grupos amino del glutamato como, 677-678, 680f
oxidación de, por anaerobios obligados, 854, 854f, 856r-857r
producción de urea a partir de, pasos enzimáticos de, 682, 683f, 684f
toxicidad de, 680-681
transporte de,
por alanina, 680, 681f
por glutamina, 678-680, 680f
amoxicilina, 226f, 227
AMP cíclico. *Véase* adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMP. *Véase* adenilato
AMPK. *Véase* proteína quinasa activada por AMP
amplificación por PCR de, 301-303, 303f, 306r-307r
amplificación, **438**
DNA
con vectores de clonación, 324-327, 324f, 325f, 326f, 327f
PCR, 301-303, 303f, 306r-307r, 331-333, 33f, 334f
en la acción de la adrenalina y el glucagón, **604**, 605f
en la producción de proteínas
etiquetas para la purificación de, 331-332, 332f, 332t
genes alterados y proteínas, 330-331, 331f
sistemas bacterianos utilizados para, 328-329, 329f
sistemas celulares de mamíferos utilizados para, 329-330
sistemas de insectos y virus de insectos utilizados para, 329, 330f
sistemas de levaduras utilizxados para, 329
vectores de expresión para, 327-328, 327f
en la señalización hormonal, 902, 907-908, 909f
en la señalización por GPCR, 445-446, 447f
en la señalización por leptina, 933-934, 934f
en la señalización por RTK, 460-463, 461f, 462f
en la transducción de señales, 437-438, 438f
en señalización de la visión 456-457, 456f
proteínas adaptadoras multivalentes implicadas en, 468, 469f
anabolismo, **29**, **492**, 493f
coordinación por AMPK del, 935-936, 936f, 936f, 937f
anaerobios facultativos, 5
anaerobios obligados, 5
análisis de doble híbrido en levadura, **339**, 340, 340f
análisis de ligamiento, **349**
localización de genes patológicos mediante, 349-351, 351f
análisis del control metabólico, **583**
aspectos cuantitativos de, 584r-585r
coeficiente de control de flujo en, 583, 583f, 584r-585r
coeficiente de elasticidad en, 583, 584r-585r,584f
coeficiente de respuesta en, 583-585, 585r
del metabolismo glucídico, 585-586, 586f
mecanismo para incrementar el flujo a través de las rutas, 586-587
medida experimental de contribuciones al flujo, 582-583, 583f
analitos, **100**
análogos del estado de transición, **214**, 215f
inhibidores de la proteasa como, 220-221, 220f, 221f
vanadato como, 414
anammox, **854**, 854f, 856r-857r
anamimoxosoma, **857r**
andamios cromosómicos, 972, 972f
andrógenos, **844**, 904.905
síntesis de, 844-845, 847f
anemia falciforme, hemoglobina en, 172-174, 172f, 173f
anemia megaloblástica, **690**
anemia perniciosa, **661r**, **689**, 690-691
anemia. *Véase también* anemia falciform
carencia de folato que produce, 689-69
deficiencia de vitamina B_{12} que produce, 661r, 689-691
aneuploidía, 1014r
ANF. *Véase* factor natriurético auricular
Anfinsen, Christian, **144**
anfolitos, **81**
anfotericina B, 379f
angina pectoris, **466**
angiogénesis, papel de VEGFR en, en cáncer, 482r-483r
ángulos diedros, de estructuras secundarias de proteínas, 124-125, 124f
anillo de la porfirina, **158**, 158f, 159f
anómeros, **246**
anotación genómica, **343**
anotación, genoma, 343
antagonistas de la vitamina K, 236
antagonistas, **441**
de los receptores β-adrenérgicos, 441, 441f
antibacterianos, lisozima, 223-225, 223f, 224f, 260
antibióticos de quinolona, 964r
antibióticos sulfa, 566r
antibióticos β-lactámicos, 225-227, 226f, 227f
antibióticos,
destrucción de dianas proteicas por, 1106, 1107f
destructores de gradientes iónicos, 422-423, 422f
dianas de la biosíntesis de nucleótidos de, 895
inhibición de la síntesis de proteínas por, 1103-1104, 1104f
inhibidores de la racemización de aminoácidos, 879
inhibidores de la topoisomerasa como, 964r-965r
mecanismos enzimáticos en el desarrollo de, 225-227, 226f, 227f
poliquétidos, 379, 379f
resistencia a, 225-227, 227f, 418, 962-963
ribointerruptores como dianas de, 1137
sulfa, 566r
anticoagulación, aproximación médica a, 235-236, 236f, 378
anticodones, **1076**, 1084, 1084f, 1085f
apareamiento del codón con, 1076-1077, 1076f, 1077t
variaciones en, 1074r-1075r
anticuerpos monoclonales, **178**
inhibidores de proteína quinasas, 482r-483r
anticuerpos policlonales, **178**
anticuerpos, **174**, 175
recombinación y, 102 unión de antígenos por afinidad y especificidad de, 177f, 178
métodos analíticos basados en, 178, 179f
sitios de, 176-177, 175f, 176f
antifúngicos, poliquétidos, 379, 379f
antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), 996
antígeno, unión por el anticuerpo de,
afinidad y especificidad de, 177f, 178
métodos analíticos basados en, 178, 179f
sitios para, 176-177, 175f, 176f
antígenos, **176**
antimicina A, 715t
antioxidantes, cofactores lipídicos, 377-378, 377f
antitrombina III (ATIII), 235f, **236**
antitrombina, heparán sulfato y, 265-266, 265f
AP endonucleasas, **1001**
Apaf-1. *Véase* factor activador 1 de la proteasa de la apoptosis, 298f, 299, **1000**
aparato de Golgi, modificación de membranas en, 390, 391f, 829
apareamiento de Hoogsteen, **292**, 292f
APOBEC. *Véase* péptido catalítico editor del mRNA de *apoB*,
apoE, 837
en la enfermedad de Alzheimer, 838r
apoenzima, **191**
apolares, grupos R alifáticos, 79, 79f
apolipoproteínas, **649**, **836**
en la enfermedad de Alzheimer, 838r
en las lipoproteínas plasmáticas, 836-838, 836f, 837t, 838r, 839f
apoproteína, **191**
apoptosis, **484**, **741**
desencadenamiento mitocondrial de, 741, 742f
desencadenamiento por fosfatidilserina de, 399
regulación de, 484-486, 486f
apoptosoma, 741, 742f
App(NH)p, 729s
aptámeros, **1063r**
Arabidopsis thaliana, síntesis de celulosa en, 796, 797f
arabinosa, 245, 246s
araquidonato, **815**
icosanoides derivados del 818-819, 818f
síntesis de, 815f, 818
árbol de la vida, 107, 108f
árbol filogenético humano, 348, 348f
árboles evolutivos, a partir de secuencias de aminoácidos, 107, 108f
ARF6, **444r**
arginasa, **682**
en el ciclo de la urea, 682, 683f, 684f
arginina, 79s, **81**, **698**, **86**
biosíntesis de, 864, 865f, 86
catabolismo de 688f, 698, 698
en catálisis ácido-base general, 199
en el ciclo de la urea, 68
en proteínas de membrana, 39
para los defectos en el ciclo de la urea, 681-682, 683, 683f, 684
propiedades y convenciones asociadas con, 77
síntesis de NO a partir de, 880-882, 882f
argininemia, 694t
argininosuccinasa, **682**
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
argininosuccinato sintetasa, **682**
en el ciclo de la urea, 682, 683f, 684f
argininosuccinato, en el ciclo de la urea, 682, 683, 684f
βARK. *Véase* quinasa de receptor β-adrenérgico,
Arnon, Daniel, 770
arquea
anaerobios obligados, anammox por, 854, 854f, 856r-857r
células de, 6-7, 6f
fijación de nitrógeno por, 855-860, 858f, 859f, 860f
lípidos de membrana únicos de, 367-368, 368f
señalización en, 474-475, 475f
Arquea, 4f, **5**
β-arrestina (βarr), **448f**, 449, 449f
arrestina 2, 448-449, 448f, 449f
arrestina I, **457**
arroz dorado, 377, 377f
arroz, enriquecimiento de β-caroteno en, 377, 377f
ARS. *Véase* secuencias de replicación autónoma
Artemis, 1016, 1016f
ASF1. *Véase* factor antisilenciador 1
asimilación de nitrato, 854, 855f
asimilación del dióxido de carbono (CO_2), **775**
activación por la luz en, 783-785, 785f
conversión del 3-fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato, 778-779, 780f
en biomasa, 776, 775f
en plantas C3, 788-791, 791f
en plantas C4, 788- 791, 791f en plantas CAM, 791- 792
fases de, 777, 775f
fijación del CO_2 en 3-fosfoglicerato, 777- 778, 776f, 778f, 779f
necesidades de NADPH y ATP para, 779- 781, 783f
regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato, 779, 781f, 782f
sistema de transporte para 781-783, 784f
asma, leucotrienos, 374
asparagina, 79s, **80**, 81, **702**
catabolismo de, 701f, 702
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
asparaginasa, **702**, 699f, 701f
para la leucemia linfoblástica aguda, 867-868
aspartame, 87s, 255r, 697
aspartato aminotransferasa (AAT), 684
ensayos de daños a los tejidos utilizando, 686r
aspartato transcarbamilasa (ATCasa), 228-230, 229f, 230f, **886**, 886f, 887, 887f
aspartato, 79s, **81**, **702**, **867**
biosíntesis de, **867**
en catálisis ácido-base general, 199f
en la biosíntesis de pirimidinas, 886, 886f, 887f

en la biosíntesis de purinas, 883, 884f
en la ruta C_4, 789, 791f
metabolismo de, 674, 675f
degradación del esqueleto carbonado, 701f, 702
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
aspartil proteasa, 220, 220f
aspirina,
como anticoagulante, 236
estimulación de la síntesis de lipoxina por, 374
inhibición de la síntesis de prostaglandinas por, 373-374, 373f, 819
ataque de corazón
ensayos de enzimas hepáticos en, 684
isozimas LDH como marcadores de, 588r
ATCasa. *Véase* aspartato transcarbamilasa
atenuación de la transcripción, **1132**
de genes para enzimas de la biosíntesis de aminoácidos, 1131-1134, 1132f, 1133f
atenuador, **1132**, 113f
ateroesclerosis, **843**, 843f
fármacos estatinas y, 843, 845r-846r
transporte inverso del colesterol por la HDL, contrarresta, 844, 844f
ATIII. *Véase* antitrombina III,
ATM, 477, 480, 484
átomos de hidrógeno, transferencias de electrones por, 518-519
ATP sintasa, **416**, **725**
catálisis rotacional por, 729-731, 731f
flujo de protones que impulsa, 731-733, 732f, 733r, 733f
como ATPasa de tipo F, 416, 416f, 727
conformaciones de la unidad β de, 729, 730f
de cloroplastos, 771, 771f
dominio F_1 de, 727, 728f, 730f
dominio F_o de, 727-728, 730f, 731-733, 732f, 733r, 733f
en el centro de reacción Fe-S, 760f, 760-761
en el centro de reacción feofitina-quinona, 759, 760f
inhibición de, 715t
inhibición inducida por la hipoxia de, 737, 738f
liberación de ATP de la, 728, 729f
ATPasas
AAA+, 998-990
Na^+K^+,
energía del ATP para, 514
en señalización eléctrica, 470-471, 471f
estructura y mecanismo de, 414f, 415-416, 415f
tipo F, 416, 416f, 727
tipo P, 414-416, 414f, 415f
tipo V, 416, 416f
ATPasas tipo F, **416**, 416f, 727
ATPasas tipo V, **416**, 416f
ATPasas tipo-P **414**
fosforilación de, 414-416, 414f, 415f
ATPsintasoma, 734, 734f
ATR, 477, 480, 483-484
atractilósido, 715t
atractivos, **475**
aurovertina, 715t
auto-ensamblaje, por organismos vivos, 2
auto-replicación, por organismos vivos, 2
autofagia, **148**
autofosforilación, **461**
de RTK, 460, 461f
autorización, **996**
autótrofos, **5**, 5f, **491**
ciclado de carbono, oxígeno y agua por, 491-492, 492f
ciclado de nitrógeno por, 492, 492f
auxina, **880**, 880f
Avandia. *Véase* rosigliotazone
Avastin. *Véase* bevacizumab
avidina, **636**
azaserina, **894**, 894f
Azotobacter vinelandii, 858-859
AZT, 1059r
azúcares reductores, 250r-251r, **251**, 252
azúcares sencillos. *Véase* monosacáridos
azúcares, 10f, 16, 243
disacáridos. *Véase* disacáridos
estereoisomerismo de, 244-245, 245f, 246f
glucosa. *Véase* glucosa
metabolismo hepático de, 911-912, 913f
monosacáridos. *Véase* anticuerpos monoclonales
nucleótidos, 792
reductores, 250r-251r, 251-253
sabor dulce de, 254r-255r
azul Coomassie, 93f, **94**

B

BAC. *Véase* cromosomas bacterianos artificiales,
bácmidos, **329**
Bacteria, 4f, **5**
bacterias endosimbióticas, evolución de cloroplastos a partir de, 772-773, 772f, 773f
bacterias gram-negativas, 6, 6f
bacterias gram-positivas, 6, 6f
bacterias halófilas, en la síntesis de ATP, 773, 774f
bacterias litotróficas, 856r
bacterias púrpura, centro de reacción feofitina-quinona, 759-760, 760f, 761f
bacterias verdes sulfuradas
centro de reacción de, 758, 760f
Fe-S, 760-761, 760f
bacterias. *Véase también Escherichia coli*
acoplamiento de transcripción y traducción en, 1099-1100, 1101f
anaerobios obligados, anammox por, 854, 854f, 856r-857r
células de, 6-7, 6f
cromosomas de
artificiales, 325-326, 326f
elementos de, 953, 954f, 954t
estructura de, 974-975m 975
D-aminoácidos en, 879
direccionamiento de proteínas en, 1109-1111, 1110f, 1111f
elongación en, 1095-1097, 1095f, 1097f, 1098f
evolución de los cloroplastos a partir de, 772-773, 772f, 773f
evolución de, 771-773, 772f, 773f
evolución mitocondrial a partir de, 37, 38f, 742-743, 743f
expresión de proteínas recombinantes en, 328-329, 329f
fijación de nitrógeno por, 855-860, 858f
fotosintéticas, centros de reacción de, 758
glutamina sintetasa en, 861-862, 861f
halofílicas, en síntesis de ATP, 773, 774f
inicio en, 1089-1093, 1089f, 1093f, 1094f
intrones en, 1041-1042
lectinas de, 271, 272t
lipopolisacáridos de, 368-369, 369f
ruta genética de, 978-980
operones en, 1123-1125, 1123f, 1124f
poliP y PPK en, 516
procesamiento del RNA ribosómico en, 1047-1048, 1048f
recombinación genética homóloga en, 1008-1010, 1008f, 1009f, 1010f, 1011f
regulación génica en
atenuación de la transcripción de genes para enzimas de la biosíntesis de aminoácidos, 1131-1134, 1132f, 1133f
coordinación de la síntesis de r-proteínas y rRNA, 1135-1136, 1135f, 1136f
inducción de respuesta SOS, 1134, 1134f
recombinación génica, 1138, 1138f, 1139t
regulación por sRNA de los mRNA, 1136-1138, 1136f, 1137f
regulación positiva del operón *lac*, 1130-1131, 1131
reparación del DNA en 998t. *Véase también* reparación del DNA
replicación del DNA en. *Véase también* replicación del DNA
ribosomas de, 1081-1083, 1082t, 1083f
señalización en, 474-475, 476f
síntesis de ácidos grasos en, 806, 814
síntesis de celulosa en, 796-797, 797f
síntesis de fosfolípidos en, 825, 826f
síntesis de glucógeno en, 792
ranscripción en
cola de poli(A) y, 1045
rifampicina y, 1038
RNA polimerasa en, 1028-1030, 1028f, 1030f
β-oxidación en, 663-664, 664f
transposición en, 1018-1020, 1019f
variaciones del código genético en, 1074r-1075r
bacteriófagos
DNA de, 951f
RNA, 1060-1062
bacteriorrodopsina, 393-394, 393f, 395f, **773**, 774f
baculovirus, **329**
expresión de proteínas recombinantes en, 329, 330f
baja glucosa sanguínea,
oposición por el glucagón de, 925-926, 927f 926t
señalización por cortisol de, 930
balanceo en, 1076-1077, 1076f, 1077t
balsas, **401**
en membranas,
esfingolípidos y colesterol en, 401-402, 401f, 402f
segregación de proteínas de señalización por, 467, 468
Baltimore, David, 1055
bandas A, 181f, **182**
bandas I, 181f, **182**, 183
Banting, Frederick G., 901r
barbituratos, metabolismo por enzima P-450 de, 817r
barrera hemato-encefálica, transporte de glucosa a través de, 409
barril α/β, **138**, 138f
barril β, 137, 137f
en proteínas de membrana, 395, 395f
base de datos Structural Classification of Proteins, 140-141, 140f
bases
aminoácidos como, 81-85, 83f, 84f, 85f
como tampones, 63-67, 64f, 65f, 66f
ionización de
agua pura, 58-59, 59f
constantes de disociación ácida y, 61-62, 61f
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de titulación y 62-63, 62f, 63f
escala de pH y, 60-61, 60f, 60t
nucleótido. *Véase* bases nitrogenadas
bases débiles
como tampones, 64-67, 64f, 65f, 66f
ionización de,
agua pura, 58-59, 59f
constantes de disociación ácida y, 61-62, 61f
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de valoración y, 62-63, 62f, 63f
escala de pH y, 60-61, 60f, 61t
bases nitrogenadas, 281-283, 282f, 282t, 283f, 284f
alquiladas, 1003, 1004f
apareamiento de, 286, 287f
determinación de la estructura del DNA y, 287-289, 289f
en el reconocimiento codón y anticodón, 1076-1077, 1076f, 1077t
en la replicación del DNA, 983-984, 984f, 985f
en la transcripción, 1030
estabilidad del DNA y, 297
Hoogsteen, 292-293, 292f
biosíntesis de
pirimidinas, 885-887, 886f, 887f, 892-893
purinas, 883-885, 883f, 884f, 885, 885f, 892-893
conformaciones de, en DNA, 290-291, 290f
degradación de
pirimidinas, 891-693, 892f, 893f
purinas, 890-894, 892f, 893f
en la replicación, 983-984, 984f
estructura de los ácidos nucleicos y, 286, 286f, 287f
metilación, 300-301
origen de, 1062, 1062f
transformaciones no enzimáticas de, 298-300, 298f, 299f, 300f
bases nitrogenasa qlauiladas, 1003-1004, 1004f
bases pirimidínicas, 281, 282, 282f, 282s, 282t
apareamiento Hoogsteen, 292, 292f
biosíntesis de,
regulación de, 886-887, 887f
rutas de novo, 885-886, 886f, 887f
rutas de recuperación, 892-893
conformaciones de, en el DNA, 289f, 290-291, 290f, 291f
degradación de, urea producida por, 891-892, 892f, 893f
estructura de los ácidos nucleicos y, 286, 286f, 287f
metilación de, 300-301
origen de, 1062, 1062f
transformaciones no enzimáticas de, 298-300, 298f, 299f, 300f
bases púricas, **281**, 282, 282f, 282s, 282t
apareamiento de Hoogsteen, 292, 292f
biosíntesis de,
regulación de, 886, 885f
rutas de novo, 883-885, 883f, 884f, 885f
rutas de recuperación, 892
conformaciones de, en DNA, 289f, 290-291, 290f, 291f
degradación de, ácido úrico producido por, 891-894, 892f, 893f, 894f

Copyrighted Material

estructura de los ácidos nucleicos y, 286, 286f, 287f
metilación de, 300-301
origen de, 1062, 1062f
transformaciones no enzimáticas de, 298-300, 298f, 299f, 300f
basófilos, en la respuesta alérgica, 177
BAT. *Véase* tejido adiposo marrón
Bateson, William, 1158r
BCRPO. *Véase* proteína de resistencia al cáncer de pulmón,
Beadle, George, 952
benceno, extracción de lípidos utilizando, 380
benzoato, para defectos del ciclo de la urea, 687, 687f
Berg, Paul, 319-320
Bergström, Sune, 373
beriberi, 555, 621
Best, Charles, 901r
beta bloqueantes, 441
bevacizumab (Avastin), 484r
Bextra. *Véase* valdecoxib
BFP. *Véase* proteína fluorescente azul
biblioteca de cDNA, **334,** 335f 336 337f
bicapa lipídica, de membranas, 389-391, 389f, 390f, 391f
balsas de esfingolípidos y colesterol en, 401-402; 401f, 402f
catálisis del desplazamiento de lípidos a través, 398-399, 399f
curvatura y fusión de, 403-405, 403f, 404f
difusión lateral en, 398-401, 399f, , 400f, 401f
lípidos en. *Véase* lípidos de membrana
ordenamiento de grupos acilo en, 397-398, 398f, 398t
proteínas en. *Véase* proteínas de membrana
proteínas integrales de membrana que abarcan, 391-395, 392f, 393f, 394f, 395f, 396f
unión covalente de proteínas a, 395-397, 396f
bicapa, **390**, *Véase también* bicapa lipídica,
bicarbonat
formación de malonil-CoA a partir de, 805-806, 806f
intercambio aniónico de, 410-412, 412f
para la acidosis, 68
bicarbonato,
biciclo de Krebs, 682-684, 685f, 686r
biguanidas, 943, 943t
bilirrubina, **876**, 877f
biliverdina, 876, 877f
biocombustibles, fermentación etanólica que produce, 556r
bioenergética, 495
de la transferencia de grupos fosforilo,
en el transporte activo y en la contracción muscular, 511, 514
en el ensamblaje de macromoléculas informativas, 514
energía proporcionada por, 510-513, 512f
cambio de energía libre en la hidrólisis de ATP, 507-509, 508f, 508t
polifosfato inorgánico como dador de grupo fosforilo, 516
compuestos fosforilados y tioésteres con grandes variaciones de energía libre de hidrólisis, 509-510, 509f, 510f, 511f, 511t
reacciones implicadas en, 513-514, 513f, 515r
en transfosforilaciones entre nucleótidos, 514-516, 516f
de gluconeogénesis y glucólisis, 556, 558t, 562, 563t
termodinámica y,
naturaleza aditiva de los cambios de energía libre, 500-501
primer y segunda leyes, 496-497, 497t
fuentes de energía libre de las células, 497
efectos de la concentración de reactivos y productos sobre los cambios reales de energía libre, 499-500
relación entre cambio de energía libre y constante de equilibrio, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
bioensayo de hormonas, 900-902, 901r, 902f
bioinformática, **104**
biología de sistemas **29, 819**
biología molecular, 949
bioluminiscencia, 515r
biomasa
celulosa en, 257
etanol a partir de, 788r-789r
biomoléculas, 1
celulares pequeñas, 13-14
estereoisomerismo de, 78
estructura del carbono y grupos funcionales de, 12-13, 13f, 14f, 15f
estructura tridimensional de, 16-19, 16f, 17f, 18f, 19f
evolución de, 33-34, 34f
interacciones estereoespecíficas de, 19-20, 19f, 20f
macromoléculas. *Véase* macromoléculas
modelos de, 16, 16f
bioquímica, fundamentos de, 1-2, 2f
celular, 3-12, 3f, 4f, 5f, 6f, 8f, 9f, 10f, 11f
evolutiva, 32-40, 33f, 3,4f, 35f, 36f, 37f, 38f, 38t
física, 20-30, 22r-23r, 27f, 28f
genética, 30-32, 30f, 31f, 32f, 24f, 25f
química, 12-20, 12f, 13f, 13r, 14f, 15f, 15t, 16f
bioseñalización. *Véase* señalización
biosíntesis de aminoácidos, 863, 863f, 864
atenuación de la transcripción de genes para, 1131-1134, 1132f, 1133f
clases especiales de reacciones en, 862, 863f
regulación alostérica de, 873-876, 876f
ruta de la ribosa 5-fosfato 871-872, 874f
rutas del 3-fosfoglicerato, 866-867, 866f, 867f
rutas del corismato, rutas 870-871, 870f, 871f, 872f, 873f
rutas del oxalacetato y del piruvato, 867-870, 868f-869f
rutas del α-cetoglutarato, 864, 865f, 866f
biosíntesis de lípidos
ácidos grasos. *Véase* síntesis de ácidos grasos
colesterol,
cuatro fases de, 831-834, 832f, 833f, 834f, 835f
destinos alternativos de intermediarios en, 845-847, 847f
regulación de, 840-844, 841f, 842f, 843f, 845r, 846r
unidades de isopreno en, 830
hormonas esteroides, 844-845, 844f
icosanoides, 818-820, 818f, 819f
lípidos de membrana,
CDP-diacilglicerol en, 825-827, 826f, 827f
esfingolípidos, 826, 826f
plasmalógenos, 827-828, 828f
precursores de, 820-821, 821f
rutas eucarióticas a la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, 827-828, 828f, 829f
transporte a membranas celulares después de, 829
unión de los grupos de cabeza de los fosfolípidos, 824-825, 825f
triacilgliceroles
gliceroneogénesis para, 823, 823f, 824f
precursores de, 820-821, 821f
regulación hormonal de, 821-823, 822f
biosíntesis de nucleótidos, 882-883
agentes quimioterápicos dirigidos contra, 894-895, 894f, 895f
clases especiales de reacciones en, 862, 863f
conversión de nucleósidos monofosfato en nucleósidos trifosfato, 887
síntesis de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos, 887-890, 888f, 889f, 890f
síntesis de pirimidinas,
regulación de, 886-887, 887f
rutas de novo, 885-886, 886f, 887f
rutas de recuperación, 892-893
síntesis de purinas
regulación de, 885, 885f
rutas de novo, 883-885, 883f, 884f, 885f
rutas de recuperación, 892-893
síntesis de timidilato, 890, 891f
biosíntesis. *Véase* anabolismo
biotina, **559**
carencia de, 636
en la degradación de aminoácidos, 688, 689f
en la reacción de la acetil-CoA carboxilasa, 805-806, 806f
en la reacción de la piruvato carboxilasa, 559, 560f, 635-637, 636f, 637f
bisulfito, daño en el DNA causado por, 300
Blackburn, Elizabeth, 1059
Blobel, Günter, 1105
Bloch, Konrad, 833
BMI. *Véase* índice de masa corporal
bocio, 906-907, 906f
Bohr, Christian, 170
bomba SERCA. *Véase* Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplasmático
bombas de protones
ATPasas tipo-V y tipo-F, 416-417, 416f
complejo de liberación de oxígeno, 768-769, 769f
bombas. *Véase* transportadores activos
bonobo, comparaciones del genoma humano con, 348-349, 348f, 349f, 350f
Botox. *Véase* toxina botulínica
Boyer, Herbert, 319-320
Boyer, Paul, 729
BPG. Véase 2,3-bisfosfoglicerato
braceína, 255r
brasinólido, 374, 374f
brazo D, **1084**, 1084f, 1085f
brazo del aminoácido, **1084**, 1084f, 1085f
brazo del anticodón, **1084**, 1084f, 1085f
brazo TψC, **1084**, 1084f, 1085f
BRCA1/2, 1008r
Briggs, G. E., 202
Brown, Michael, 838, 846r
Bruce, Ames, 997
BSE. *Véase* encefalopatía espongiforme bovina
Buchanan, John M., 883, 894
Buchner, Eduard, 190, 562
bucle P, **443r**
de proteínas G, 442r-443r
bucle β-α-β, **137**, 137f, 138f
bungarotoxina, 430
butirato, 940
butiril-ACP, 809f, **810**
Byetta. *Véase* exenatide

C

C, *Véase* citosina
C, *Véase* coeficiente de control de flujo
Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (bomba SERCA), **415**
estructura y mecanismo de, 414-415, 414f, 415f
Ca^{2+} ATPasa, 414f, 415
Ca^{2+}. *Véase* ion calcio,
cadena ligera de la inmunoglobulina, plegamiento incorrecto de, 1149-150
cadena respiratoria mitocondrial,
anatomía de las mitocondrias y, 708, 709f
complejos multienzimáticos de transportadores electrónicos implicados en,
Complejo I, 713-715, 713t, 714f, 715t
Complejo II, 713t, 714f, 715-716, 716f
Complejo III, 713t, 714f, 716-717, 716f, 717f
Complejo IV, 713t, 714f, 717-718, 718f, 738f, 738-739
convergencia de electrones hacia aceptores universales de electrones, 708-710, 710t
donación de electrones vía ubiquinona, 719-720, 719f
generación de ROS por, 715, 722-723, 723f
genes que codifican proteínas de, 741-742, 742t, 743f
gradiente de protones en, 720-722, 722f
oxidación del NADH en mitocondria de plantas, 723, 724r-725r
paso de electrones a través de transportadores unidos a la membrana, 710-713, 711f, 712f, 712t, 713f
respirasomas en, 718-719, 719f, 720r-721r
cadena respiratoria, **708**. *Véase también* cadena respiratoria mitocondrial
cadenas ligera kappa, 1020-1021, 1020f
cadenas ligeras,
inmunoglobulina, 176-177, 175f, 176f
recombinación en, 1020-1021, 1020f
miosina, 179-182, 180f
cadenas pesadas
inmunoglobulina, 175f, 176-177, 176f
recombinación en,1020-1021, 1020f
miosina, 180, 180f
caderinas, **405**
CAF1. *Véase* factor 1 de ensamblaje de cromatina
caimanes, fermentación ácido láctica por, 554r
Cairns, John, 982, 986
caja homeo, **1127**
calcitriol, 905
cálculos renales, 694
calentamiento global, 788r-789r
calmodulina, **451**
unión de Ca^{2+} por, 452-453, 455f, 455t
calor de vaporización,
de disolventes comunes, 48t
del agua, 47-49, 48t

calor
producción en plantas de, 723, 724r-725r
producción mitocondrial de, 740, 740f
producción por el tejido adiposo marrón de, 740, 740f, 915-916, 915f, 916f
Calvin, Melvin, 776
CaM quinasas. *Véase* proteína quinasas dependientes de Ca2+/
CaM. Véase calmodulina
cambio (variación) de energía libre (ΔG), 23, **24**
de la formación de acil graso-CoA, 513
de la gluconeogénesis y de la glucólisis, 558, 558t
de la síntesis de ATP en la superficie de la ATP sintasa, 728, 728f
de transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, 720-722
en el transporte activo contra un gradiente de concentración o electroquímico, 414
en reacciones enzimáticas, 192-194, 192f, 193f, 197, 197f
en sistemas biológicos, 496-497
naturaleza aditiva de, 500-501
relación de la constante de equilibrio con, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
cambio climático, 788r-789r
cambio de energía libre estándar en reacciones bioquímicas ($\Delta G'°$), **193**
de síntesis de ATP en la superficie de la ATP sintasa, 728, 728f
elación de la constante de equilibrio estándar con, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
cAMP. Véase adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Campto. *Véase* irinotecan
camptotecina, 965r
canales de Ca^{2+} accionados por voltaje, **471**
potenciales de acción producidos por, 471, 472f
canales de Ca^{2+}
de apertura por voltaje, potenciales de acción producidos por, 471, 472f
estructura y especificidad de, 427
proteína quinasas dependientes de C^{a2}+/ calmodulina (CaM quinasas), **452**
canales de compuerta regulados por ligando, **425**
canales de K^+ accionados por voltaje, 426-427, 428f, **471**
potenciales de acción producidos por, 471, 472f
canales de K^+ de apertura por ATP, **923**, 925, 926f
en la screción de insulina, 924-925, 926f
canales de Na^+ accionados por voltaje **471**
potenciales de acción producidos por, 471, 472f
canales de Na^+,
accionados por voltaje, potenciales de acción producidos por, 471-473, 472f
en la función neuronal, 427
estructura y especificidad, 427
canales iónicos accionados por voltaje, **425**, **471**
en la función neuronal, 427-430
potenciales de acción neuronales producidos por, 471, 472f
canales iónicos de compuerta, 407, 407f, 425-426
canales de K^+, 426-427, 428f
como receptores de señal, 439, 440f
dianas de toxinas, 472-473
neurotransmisores que interaccionan con, 472
potenciales de acción neuronales producidos por, 471-472f
señalización eléctrica por, 470-471, 471f
en neuronas, 427-430, 471, 472f
señalización eléctrica por, 470-471f
canales iónicos selectivos, **425**
canales iónicos, **407**
CFTR, 417-418, 419r-420r
defectivos, 419r-420r, 430, 430t
en la función neuronal, 427-430
estructura y mecanismo de, 406-408, 407f
K^+. *Véase* canales K^+
medición eléctrica de, 425f, 426
movimiento iónico por, 425-426
toxinas dirigidas a, 430, 472
canales K^+,
accionados por ATP, 924-925, 926f
accionados por voltaje, 426-427, 428f
potenciales de acción producidos por, 471, 472f
estructura y especificidad de, 426-427, 427f, 428f
canalización de sustratos, **621**
en el ciclo de la urea, 682
en el ciclo del ácido cítrico, 639, 639f
en el complejo PDH, 620-621, 621f
cáncer colorrectal no polipósico hereditario, 1007r
cáncer colorrectal, mutaciones en, 481-484, 485f
cáncer de colon, 1008r
cáncer de mama, 1008r
inhibidores de proteína quinasa para, 482r-483r
medicamentos basados en hormonas dirigidos a, 473-474
cáncer de piel, 1007r-1008r
cáncer de pulmón, inhibidores de la proteína quinasa en, 482r-483r, 484r
cáncer. *Véase también* tumores
inhibidores de proteína quinasa para, 482r- 483r-484r
medicamentos basados en hormonas dirigidos al, 473- 474
mutaciones en, 997, 997f,1007r- 1008r
papel de la selectina en, 271
reparación del DNA y, 1007r- 1008r
retrovirus productores de, 1057, 1058f, 1059r
unión de extremos no homólogos y, 1015- 1016, 1016f
Candida albicans, variaciones del código genético en, 1074r- 1075r
canitina palmitiltransferasa 2 (CPT2), **651**, 652f
cannabinoides, regulación de la masa corporal por, 938-939, 939f
cantaxantina, 378f
capa de solvatación, **116**
estabilidad proteica y, 116-118
captación de glucosa
en diabetes mellitus tipo 1, 411r, 545-546, 548f
en diabetes mellitus, 930-931
en tumores, 546r-547r
estimulación por insulina de, 923, 924f, 923t
por diversos tejidos, 410, 411r, 545, 548f
carbamil fosfato
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
en la biosíntesis de pirimidinas, 885-886, 886f, 887f
carbamil fosfato sintetasa I, **682**
deficiencia, 694t
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
regulación de, 684-685, 685f
carbamil fosfato sintetasa II, **886**, 886f, 887f
carbamil glutamato, para defectos del ciclo de la urea, 686- 687, 687t
carbocatión, **502**
en la formación o rotura de enlaces carbono-carbono, 502-503, 503f, 504f
carbocation, **502**
en la formación o rotura de enlaces carbono-carbono, 502- 503, 503f, 504f
carbónico anhidrasa, **170**
carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), desacopla de la fosforilación oxidativa, 715t, 727, 727f
carbono anomérico, **246**
carbono, en biomoléculas, 12-13, 13f, 14f,15f
carboxipeptidasas A y B, **675**, 676- 677
carcinógenos, 480
carcinoma de células renales 484r
cardiolipina, 365-366, 366f, **825**
en respirasomas, 719
síntesis de, 826f, 825-827, 827f
carga eléctrica 84
de aminoácidos, 84
en clorofila, 756-757, 759f
carnitina aciltransferasa 1, **651**, 652f
regulación de, 659, 659f
carnitina aciltransferasa 2, **651**, 652f
carnitina palmitiltransferasa 1 (CPT1) **651**, 652f
regulación de, 659, 659f
carnitina, **651**
caroteno, 379, 378f
β-caroteno
absorción de la luz por, 755
como precursor hormonal, 375-377, 376f, 377f, 906
estructura de, 756f
carotenoides, **376**, **755**
absorción de la luz por, 755
estructura de, 756f
cartografiado de desnaturalización, **982**
carvona, 375
CAS. Véase proteína quinasa II de susceptibilidad para la apoptosis
cascada de coagulación, 234-236, 234f, 235f, 236f
vitamina K en, 378
cascada reguladora, **234**
en la coagulación de la sangre, 234-236, 234f, 235f, 236f
cascadas enzimáticas, **488**, **604**
desencadenamiento por la leptina de, 933-934, 934f
en la acción de la adrenalina y el glucagón, 604, 605f
en la señalización hormonal, 902
en la señalización por GPCR, 441, 447f
en la señalización por RTK, 460-463, 461f, 462f
en la transducción de señal, 437-438, 438f
proteínas adaptadoras multivalentes implicadas en, 468-470f
cascadas hormonales, 902, 907-908, 908f, 909f
cascadas MAPK, **463**, 462f
proteínas adaptadoras multivalentes implicadas en, 467-468, 470f
caseína quinasa II (CKII), **608**
regulación de la glujcógeno sintasa por, 608-609, 608f
caspasa 8, en apoptosis, **485**, 486f
caspasa 9, en apoptosis, 486, 486f, 741, 742f
caspasas, **741**
en apoptosis, 486, 486f, 741, 742f
casquete 5', **1040**
de los mRNA eucarióticos, 1040, 1040f
catabolismo de aminoácidos, 673-674, 674f
catabolismo, **28**, **492**, 493, 493f
coordinación por AMPK de, 935-936, 936f, 937f
síntesis de compuestos fosfato de alta energía, 512
catalasa, 300, **663**
catálisis ácido-base
enzimática, 199, 199f
quimotripsina, 217, 217f
catálisis ácido-base específica, **199**
catálisis ácido-base general, **200**
enzimática, 199, 199f
quimotripsina, 217, 217f
catálisis covalente, enzimática, 200
catálisis
enzimática, 28-29, 27f, 28f, 189
ácido-base, 199, 199f
cinética de. *Véase* cinética enzimática
covalente, 200
en el sitio activo, 192, 192f
energía de unión en, 196-199, 196f, 196f, 197f, 198f
especificidad de, 195-196, 196t, 197-199, 196f
ion metálico, 200
papel del estado de transición en, 196-197, 195f, 196f, 197f
principios de, 195-196, 196t
regulación de, 575-578, 576f, 576t, 577f, 578f, 578t
termodinámica de, 194-196, 195t, 500
velocidad de reacción y efectos de equilibrio durante, 192-194, 192f, 193f
por RNA, 34-35, 35f
ribozimas, 296, 296f 1062-1064, 1063r, 1064-1065, 1064f, 1081-1082
catálisis por ion metálico
enolasa, 222-223, 222f
enzimática, 200-201
catálisis rotacional, **729**
en la síntesis de ATP, 729-730, 731f, 732f
el flujo protónico impulsa, 731-733, 732f, 733f, 733r
catecolaminas, **904**
clase de, 904
descarboxilación de aminoácidos con producción de, 880, 881f
catenanos, **983**, **994**, 995f
caveolas, **402**, 402f
segregación de proteína señalizadora por, 468-469
caveolina, **402**, 402f, 1111, 1111f
cavidades revestidas, **1111**, 1112f
CDK. *Véase* proteína quinasa dependiente de ciclina
cDNA. *Véase* DNA complementarios
CDP-diacilglicerol, **825**
en síntesis de fosfolípidos, 825, 826f, 827f
CDP. *Véase* citidina difosfato
cebado, **608**, 608f
cebadores, **301**
en la replicación de DNA, 983, 984f, 987
en PCR, 301-303, 303f
Cech, Thomas, 1042
ceguera de color, 457, 458r
ceguera nocturna, defectos en la proteína G en, 443r
ceguera, deficiencia de vitamina A que produce, 376
celacantos, fermentación láctica por, 554r

Confidential

Celebrex. *Véase* celecoxib
celecoxib (Celebrex), 819
células animales, estructura de, 7, 8f
células B de memoria, 177
células B, **175**, 175t, 177
células bastones señalización por GPCR en, 456-458, 456f
células cono, señalización GPCR en, 456f, 457, 457f, 458r
células de mamífero, expresión de proteínas recombinantes en, 330
células espumosas, **843**
células excitables, señalización eléctrica en, 470-471, 471f
células grasas, triacilgliceroles en, 362-363, 362f
células madre adultas, **1157**
células madre embrionarias, **1157**, 1160
células madre multipotentes, **1158**
células madre pluripotentes, **1157**, 1158-1160, 1160f
células madre totipotentes, 1160f, **1166**
células madre unipotentes, **1157**
células madre, **1157**
control de, 1157-1160, 1157f, 1160f
células mesófilas, 789-791, 791f
células pancreáticas α, 923, 924, 925f
células pancreáticas β
mitocondrias defectuosas en, 745-746, 746f
secreción de insulina por, 923, 924f, 925f, 926f
células pancreáticas δ, 923, 924f, 925f
células rojas sanguíneas. *Véase* eritrocitos
células salvajes, **32**
células T asesinas. *Véase* células T citotóxicas
células T citotóxicas (T_C), **175**, 175t
células T cooperadoras (T_H), **175**, 175t
células T, **175**, 175t
células T_C. *Véase* células T citotóxicas
células TH. *Véase* células T colaboradoras
células túnico-vasculares, 789-791, 791f
células vegetales,
estructura de, 7, 8f
mitocondrias de, oxidación de NADH en, 723, 724r-725r
células β. Véase células β pancreáticas,
células, 11-12
bacterianas y de arqueas, 6-7, 6f
características de, 3, 3f
concentraciones de ATP en, 508-509
concentraciones de proteínas en, 1119, 1120f
diferenciación de, 575, 1157-1160, 1157f, 1160f
dimensiones de, 3-4, 4f
en la respuesta inmune, 174-176, 175t
estructuras supramoleculares de, 9-10, 10f, 11f
estudios in vitro de, 10-11, 11f
eucarióticas, 7-8, 8f, 9f
evolución de, 35-37, 36f, 37f, 38f
fuentes de aminoácidos para, 673
fuentes de energía libre en, 497
fuentes de energía y precursores biosintéticos de, 5-6, 5f
fuentes de grasa de, 648
importación de proteínas al interior de, 1111-1112, 1111f, 1112f
localización de proteínas dentro, 336-338, 337f,338f
macromoléculas de, 9-10, 10f, 11f, 15-16, 15t
mantenimiento del estado estacionario dinámico en, 575
pequeñas moléculas de, 13-14
primera, 35-36, 36f
sellado por membranas. *Véase* membranas
tampones en, 65-68, 65f, 66f, 67f, 68r
celulasa, 257, 257f, 459
celulosa sintasa, **796**
celulosa, 243, **257**
enlace glucosídico en, 258f
estructura de, 796, 796f
estructura y papeles de, 262t
papel estructural de, 257-258 257f
plegamiento de, 258-260, 258f, 259f, 260f
síntesis de, 796-797, 796f, 797f
celulosomas, 257
CENPA, 970r
centro de reacción de *Rhodobacter sphaeroides*, 759, 761f
centro de reacción de *Rhodopseudomonas viridis*, 759, 761f
centro de reacción feofitina-quinona, 759-761
estructura de, 761f
modelo funcional de, 759, 760f
transferencias electrónicas en, 759-760, 761f
centro de reacción fotoquímico Fe-S, 760, 760f
en fotosistema I, 764f, 765
centro de reacción fotoquímico, **756**, 758f
complejo de liberación de oxígeno, 768-769, 769f
complejo del citocromo b_6f, 765-766, 766f
determinación de, 758
en plantas, 762-763, 762f
factores cinéticos y termodinámicos en, 761-762
Fe-S, 760f, 760
feofitina-quinona, 759-761, 760f, 761f
flujo electrónico cíclico en, 765-766
fotosistema I, 765, 764f
fotosistema II, 763-765, 763f, 764f
tipos de, 758
transiciones de estado y distribución de, 766-768, 767f, 768f
centro de reacción P680
complejo de liberación de oxígeno y, 768-769, 769f
descubrimiento de, 758
en el flujo electrónico, 764, 764f
en fotosistema II, 762-763,762f
centro de reacción P700,
descubrimiento de, 758
en el flujo electrónico, 765-766, 764f
en el fotosistema I, 762, 762f
flujo electrónico cíclico con, 765-766
centro de reacción P870
conversión interna y, 762
descubrimiento de, 758
en el centro de reacción Fe-S, 760f, 762
en el centro de reacción feofitina-quinona, 759, 760f
centro ferro-sulfurado, **625**
de la aconitasa, 625, 626r-627r, 627f
centrómero, **956**, 956f
centros quirales, **16**, 17f, 17-19, 18f, 18r, 76
en aminoácidos, 76, 78,78f
en monosacáridos, 244-245, 245f, 246f
cera de abejas, 364, 364f
ceramidas, **368**, 369f
como señal intracelular, 913
ceras, como almacenes energéticos y repelentes de agua, 362-364, 364f
cerebro
amoníaco en, 681
durante ayuno o inanición, 927-929, 927t, 928f, 929f
funciones metabólicas de, 920-921, 920f
requerimientos de glucosa de, 581, 920-921, 920f
utilización de cuerpos cetónicos por, 666
cerebrósidos, **368**, 369f, **828**
síntesis de, 828, 831f
ceruloplasmina, papel de las lectinas en la destrucción de, 270
cerveza, fermentación alcohólica que produce, 556r
cetoacidosis, **545**, **668**, **931**
cetoaciduria de cadena ramificada. *Véase* enfermedad del jarabe de arce en la orina
β-cetoacil-ACP reductasa (KR), 809f, **810**
β-cetoacil-ACP sintasa (KS), **808**, 809f
β-cetoacil-CoA transferasa, **667**, 667f
β-cetoacil-CoA transferasa, aminoácidos cetogénicos, 809f
β-cetoacilp-CoA, 653f, **654**
α-cetoglutarato, **625**
biosíntesis de aminoácidos a partir de, 864, 865f, 866f
como precursor biosintético, 633
conversión de aminoácidos a, 688f, 698-700, 698f
oxidación del isocitrato a, 623f, 625-626, 628f
oxidación en el ciclo del ácido cítrico de, 623f, 628-629, 628f
transferencia de grupos α-amino a, 677, 677f, 678f, 679f
cetosas, **244**, 244f
centros asimétricos de, 244-245, 245f, 246f
cetosis, **668**, **930**
cetuximab (Erbitux), 484r
CF. *Véase* fibrosis quística
CFP. *Véase* proteína fluorescente cian
CFTR. *Véase* proteína reguladora de la conductancia
cGMP PDE. *Véase* GMP cíclico fosfodiesterasa
cGMP. *Véase* guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
Chalfie, Martin, 336
Chângeux, Jean-Pierre, 168
chaperonas de histonas, **969**, 970r
chaperonas, **146**, 147, 147f, 148f
chaperoninas, **146**, 147, 148f
Chargaff, Erwin, 287
chi, **1009**
chimpancé, comparaciones del genoma humano con, 348-349, 348f, 349f, 350f
ChIP. Véase inmunoprecipitación de la cromatina
ChREBP. Véase proteína de unión al elemento de respuesta a glúcidos
Cialis. Véase tadalafil
cianobacterias,
centro de reacción de, 758
fosforilación/fotofosforilación en, 772-773, 772f, 773f
cianocobalamina, **660r**
cianuro, 715t
ciclado autótrofo y heterótrofo del oxígeno, 491-492, 492f
ciclina, 476
degradación controlada de, 477-478, 478f
regulación de CDK por, 477, 477f, 478f
regulación por el factor de crecimiento de, 478, 479f
ciclo C_4, **788**
ciclo celular
cambios cromosómicos durante, 966, 966f
cuatro fases del, 476, 476f
ciclo de Calvin, **776**
activación por la luz en, 783- 785, 785f
conversión del 3-fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato, 778, 780f
en plantas C_4, 788-791, 791f
en plantas CAM, 791-792
fijación de CO_2 en 3-fosfoglicerato, 776f, 777-779, 778f, 779f
necesidades de NADPH y ATP para, 779-781, 783f, 784f
regeneración de ribulosa 1,-bisfosfato, 779, 781f, 782f
rubisco en, 777-778, 776f, 778f
sistema de transporte para, 781- 783, 784f
ciclo de Cori, 554r, 557, 606r
en músculo, 919, 920f
ciclo de Krebs, 617r
ciclo de la glucosa-alanina, **680**, 681f
ciclo de la urea, **682**
defectos en, 686-687, 686t , 687f
el ciclo del ácido cítrico está conectado a, 682-685, 685f, 686r
interconexiones de la ruta que reducen el coste energético de, 686
pasos enzimáticos de, 682, 683f, 684f
regulación de, 684-685, 685f
ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), **617**. *Véase también* ciclo del ácido cítrico
ciclo de los triacilgliceroles, **822**, 828f
ciclo de sustrato, **587**
ciclo del ácido cítrico, **617**
biotina como portador de grupos CO_2 en, 635-637, 636f, 637f
como fase de la respiración celular, 617, 618f
como ruta metabólica cíclica, 622, 623f
conservación de la energía de oxidación en, 631-633, 633f, 633t
el ciclo de la urea se une a, 682-684, 685f, 686r
en el hígado, 912, 913f
evolución de, 633-634
gluconeogénesis a partir de intermediarios de, 562-563, 563t
historia de la investigación, de, 632r
intermediarios biosintéticos a partir de, 634, 635f
motivos de la complicación de, 633-634, 634f
mutaciones causantes de cáncer en, 639-640, 639f
ocho pasos de
conversión de succinil-CoA en sujccinato, 623f, 628-630, 629r, 630r
formación de citrato, 623f, 624, 624f, 625f, 632r
formación de isocitrato vías cis-aconitato, 623f, 625, 626r-627r, 627f
hidratación de fumarato a malato, 623f, 631
oxidación de α-cetoglutarato a succinil-CoA y CO_2, 623f, 626, 628f
oxidación de isocitrato a α-glutarato, 623f, 625-626, 628f
oxidación de malato a oxalacetato, 623f, 631
oxidación de succinato a fumarato, 623f, 630-631
producción de acetil-CoA para, 617
canalización de sustratos en el complejo PDH, 621, 621f
coenzimas del complejo PDH, 619, 619f, 620

SOFTSTATION

descarboxilación oxidativa del piruvato, 618-619, 619f
en la oxidación de ácidos grasos, 652, 653f, 655-657, 657t
enzimas del complejo PDH, 619-620, 620f
regulación alostérica y covalente de, 637-638, 638f
reacciones anapleróticas que rellenan intermediarios, 634-635, 635f, 635t
regulación de,
canalización de sustratos, 639, 639f
defectos en, 639-640, 639f
en pasos exergónicos, 638-639
regulación alostérica y covalente del complejo PDH, 637-638, 638f
sentido químico de la secuencia de reacciones utilizada en, 622-624, 623f
ciclo del agua, 491-492, 492f
ciclo del carbono, 491-492, 492f
ciclo del glioxilato, **634**, **795**
en plantas, 794-796, 795f
ciclo del nitrógeno, 492, 492f, **854**
nitrógeno biológicamente asequible en, 854-865, 854f, 855f, 856r-857r
ciclo del oxígeno, 491-492, 492f
ciclo fotosintético de reducción del carbono, **766**
ciclo fotosintético del carbono, **788**
ciclo inútil, **587**
ciclo oxidativo fotosintético del carbono, **788**
ciclo Q, 717, 717f
ciclo TCA. *Véase* ciclo de los ácidos tricarboxílicos
cicloheximida, 1104, 1105s
ciclooxigenasa (COX), **818**
en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, 818-819, 818f
ciclooxigenasa 1 (COX-1) 819
ciclooxigenasa 2 (COX-2), inhibición de, 373-374, 373f, 819
cicloserina, **879**
cimetidina (Tagamet), 880
cinamato, 880f
cinética
de los centros de reacción fotoquímicos, 762
del transporte de glucosa, 408, 408f
enzimáticas. *Véase* cinética enzimática
cinética de Michaelis-Menten, **204**
cinética del estado pre-estacionario, 208-209, 209f
de la quimotripsina, 216f, 217
cinética en el estado estacionario, **202**
cinética enzimática, **201**
ecuación de Lineweaver Burk 204r
ecuación de Michaelis-Menten, 203, 203f
con un inhibidor acompetitivo, 210
con un inhibidor competitivo, 210
con un inhibidor mixto, 211
en reacciones bisustrato, 206-208, 207f
transformaciones de, 204
efectos del pH sobre, 208, 208f
enzimas alostéricos, 229-230, 230f
estado pre-estacionario, 208-209, 209f
inhibición irreversible, 210-212, 212f, 213r-214r, 215f
inhibición reversible, 210-212, 210f, 211r, 211t
k_{cat}, 205, 205t K_m, 203, 203f
comparaciones enzimáticas mediante, 205-206, 205t
determinación de, 204r, 206
efectos de un inhibidor reversible sobre, 210-211, 211t
interpretación de, 204-205, 204t, 205t
regulación metabólica y, 576f, 577, 577f
para reacciones con dos o más sustratos, 206-208, 207f
relación entre concentración de sustrato y velocidad de reacción, 201-202, 201f
cuantificación de, 202-203, 203f
V_m, 201-203, 201f, 203f
enzimas alostéricos, 229-230, 230f
V_{max}, 201-202, 201f, 203f
enzimas alostéricos, 229-230, 230f
efectos de un inhibidor reversible sobre, 210-211, 211t
Cipro. Véase ciprofloxacino
ciprofibrato, 937
ciprofloxacino (Cipro), 964r
circultos proteicos, **468**
circulación enterohepática, 839f, **840**
cirugía bariátrica, 943, 944f
cirugía bariátrica, 943, 944f, 943t
cirugía de by-pass gástrico, 942-943, 944f, 943t
cis- aconitato, **625**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 625, 626r-627r, 627f
cistationina β-sintasa, 866-867, 867f
cistationina γ-liasa, **867**, 867f
cisteína, **79s**, **80**, 81, 81f, **691**, **866**
biosíntesis de, 866, 867f
catabolismo de, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
en catálisis ácido-base general, 199f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
cistina, **81**, 81f
citidilato (CMP), 283s, **514**
biosíntesis de, 886, 886f, 887f
degradación de, 891-892, 892f, 893f
citidilato sintetasa, **886**, 886f
citidina difosfato (CDP), en la síntesis de fosfolípidos, 824-825, 825f
citidina trifosfato (CTP)
como transportador de energía química, 311-313, 311f, 312f
regulación de la biosíntesis de pirimidinas por, 887, 887f
citidina, 283s
citocromo *c*
composición de, 86-87, 87t, 88t
en la cadena respiratoria mitocondrial, Complejo II transferencia electrónica al, 713t, 714f, 716, 716f, 717, 717f
en el desencadenamiento mitocondrial de la apoptosis, 741, 742f
citocromo c_1, funciones duales de, 773, 773f
citocromo *f*, cadena de agua en, 55, 56f
citocromo oxidasa, 713t, 714f, **717**, 718, 718f
lípidos asociados con, 394
citocromos, **711**
en la cadena respiratoria mitocondrial, 711-712, 711f, 712t
citoesqueleto, **7**
de las células eucarióticas, 7-8, 9f
citoglobina, función de, 159
citoplasma), **3**, 3f
organización del citoesqueleto, 7-8, 9f
citoquinas, 175
regulación del ciclo celular por, 479, 479f
citosina, **283s**, 284f
apareamiento de bases de, 286, 287f
biosíntesis de, 886, 886f, 887f
desaminación de, 298-299, 298f
degradación de, 891-892, 892f, 893 metilación de, 300-301
citosol, **3**, 3f
lanzadera del acetato al, 812, 813
síntesis de ácidos grasos en, 811-812, 811
síntesis de sacarosa en, 792-793, 793f
citrato liasa, **812**, 813f
citrato sintasa, **624**, **812**, 813f
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 624-625, 624f 625f
estructura de 624, 624f
regulación de 638f, 639
citrato, **624**
en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, 812-814, 813f
formación en el ciclo del ácido cítrico de, 623f, 624-624, 624f, 625f, 632r
lanzadera de acetato como, 812, 813f
regulación de PFK-1 y FBPasa-1 por, 590-591, 590f
citrulina, **81**, 82s
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
CKII. *Véase* caseína quinasa II
Cl-. *Véase* ion cloruro
clatratos, **52**
clatrina, **1111**, **1112f**
Clausius, Rudolf, 22r
clon, **176**, 320
clonado del DNA, **320**
adaptaciones PCR para, 333-334, 333f, 334f
aislamiento de genes mediante, 320-321
endonucleasas de restricción y DNA ligasa en, 320-324, 321f, 321t, 323f
pasos de, 320
producción de proteínas utilizando
etiquetas para la purificación de, 331-333, 332t, 332f
genes alterados y proteínas, 330-331, 331f
sistemas bacterianos utilizados para, 328, 329f
sistemas celulares de mamífero utilizados en, 329-330
sistemas de insectos y virus de insectos utilizados en, 329, 330f
sistemas de levadura utilizados en, 329
vectores de expresión para, 327-328, 328f
vectores, 320
BAC, 326, 326f
expresión, 328, 328f
plásmidos, 324-325, 324f, 325f
YAC, 326-327, 327f
clonado. *Véase* clonado del DNA
clopidogrel (Plavix), 313-314
cloranfenicol, **1103**-**1104**, 1103f
clorofila a
en fotosistema I, 762
en fotosistema II, 762
en LHCH, 756, 758f
en P680, 762
en P700, 762
en P870, 769
espectro de absorción de, 755, 757f
estructura de, 756f
clorofila b
en fotosistema I, 762
en fotosistema II, 762
en LHCII, 756, 758f
en P680, 762
en P700, 762
espectro de absorción de, 755, 757f
estructura de, 756f
clorofilas, **755**
absorción de la luz por, 755, 757f
estructura de, 755, 756f
transferencia de excitones por, 756-758, 758f, 759f
cloroformo, extracción de lípidos utilizando, 380, 380f
cloroplastos, **7**, 8f, **752**
absorción de la luz por, 754-755, 755f
ATP sintasa de, 771, 771f
como plastidios, 753-754, 753f, 754f
estructura de, 752-753, 752f, 753f
evolución de, 36-37, 38f, 772-773, 772f, 773f
galactolípidos y sulfolípidos en, 367, 367f
genoma de, 319
gluconeogénesis en, 794-796, 795f
intrones en, 1041
producción de almidón en, 780, 792
síntesis de ácidos grasos en, 811-812, 811f
sistema antiport Pi-triosa fosfato en, 781-783, 784f
sistemas de reacción fotoquímicos en, 762, 762f
Clostridium acetobutyricum, 557
CMP. Véase citidilato
CO. Véase monóxido de carbono
CO_2. Véase dióxido de carbono
CoA. Véase coenzima A
coactivadores, **1142**
unión al DNA, en el ensamblaje del factor de transcripción, 1141-1144, 1143f, 1145f
coagulación de la sangre
cascada de zimógenos en, 234-236, 234f, 235f, 236f
control médico de, 236, 236f vitamina K en, 378
cobalamina. Véase vitamina B12
cobrotoxina, 430, 472
cociente de acción de masas (*Q*), **499**, **578**-**579**, **737**
en regulación metabólica, 578-579, 579t
cocodrilos, fermentación láctica en, 554r
código de azúcares, 269-270
interacciones lectina-glúcido en, 273, 273f, 274f
lectura por lectinas de, 270-272, 271f, 272f
código genético,
descifrado del, 1070, 1070f
moldes de mRNA artificiales utilizados para, 1070-1073, 1071f, 1072f, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
expansión del, 1090r-1092r
CODIS. Véase Sistema de índice de DNA combinado
codón de inicio (5')AUG, inicio de la síntesis de proteínas por, 1088f, 1089, 1093f, 1094f, 1096t
codones de inicio, **107**
inicio de la síntesis de proteínas por, 1088f, 1089, 1093-1095, 1093f, 1094f, 1095f, 1096t
codones de terminación, **1073**, 1073f
terminación de la síntesis de proteínas por, 1097-1098, 1099f, 1100r
variaciones en, 1074r-1075r
codones degenerados, **1078**, 1076t

COPYRIGHTED

codones sin sentido. *Véase* codones de terminación
codones stop. *Véase* codones de terminación
codones, 952, 952f, **1070**, 1071f
apareamiento del anticodón con, 1076-1077, 1076f, 1077f
determinación de, 1070-1073, 1071f, 1072t, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
expansión del código genético y, 1090r-1092r
inicio, 1073
inicio de la síntesis de proteínas por, **1089**, 1089f, 1093-1095, 1093f, 1094f, 1095f, 1096t
variaciones en, 1074r-1075r
coeficiente de control de flujo (c), **583**, 583f, **584r**
aspectos cuantitativos de, 584r-585r
coeficiente de elasticidad (ε), **583**, **584r**, 584f
aspectos cuantitativos de, 584r-585r
coeficiente de Hill (η_H), **167**
en la regulación metabólica, 578, 578t
coeficiente de respuesta (R), **584**, 585, 585r
aspectos cuantitativos de, 585r
coenzima (CoA), 313, 312f, 619s
en el complejo PDH, 619, 619f, 620f
coenzima B12, 658f, **659**, 660r-661r
coenzima Q. *Véase* ubiquinona
coenzimas, 3, 188. *Véase* también coenzimas específicos **3**, **190**
adenosina en, 313, 312f
como transportadores electrónicos, 521-522
ejemplos de, 190, 191t
cofactor FeMo, **855**, 858, 858f
cofactores, 188, 506. *Véase* también cofactores específicos **190**, 506
adenosina en, 313, 312f
en degradación de aminoácidos, 677, 677f, 678f, 679f, 688-691, 689f, 690f, 691f
iones inorgánicos que actúan como, 190, 190t
lípidos como,
dolicoles, 377f, 377-378
quinonas lipídicas, 377
vitaminas E y K, 377-378, 377f
para corte y empalme (splicing) de intrones, 1041, 1041f, 1042f
Cohen, Stanley, 319-320
cohesinas, 974-975, 973f, 974f 1011
cointegrado, **1019**
col fétida (Symplocarpus foetidus), 724r-725r
cola de poli(A), **1045**, 1045f, 1046f
colágeno, **130**
estructura y función del, 130-131, 137f, 128r-129r, 130f
colecalciferol, **735**
como precursor hormonal, 375-377, 375f
colecistoquinina, **675**
cólera, interacciones de gangliósidos en, 370
colesterol **370**
anillos fusionados carbonados del, 370, 370f como lípido de membrana 370, 370f
balsas de, 401-402, 401f, 402f
fluidez de la bicapa lipídica y, 398
destinos metabólicos de, 834-836, 835f
efectos de los ácidos grasos trans sobre, 363, 363f
endocitosis facilitada por receptor de, 838-839, 840f
hormonas esteroides derivadas de, 372, 374, 374f, 834, 835f, 844, 844f, 847f
síntesis de,
cuatro fases de, 831-834, 831f, 832f, 833f, 834f, 835f
destinos alternativos de intermediarios en, 845-847, 847f
regulación de, 840-844, 841f, 842f, 843f, 845r-846r
unidades de isopreno en, **830**
transporte de,
por HDL, 836f, 837t, 839f, 839-840, 841f, 844, 844f
por lipoproteínas plasmáticas, 836-838, 836f, 837f, 838f, 839f
por endocitosis facilitada por receptor, 838-839, 840f
regulación de, 840-844, 841f, 842f, 843f, 845r-846r
colesterol biliar, 834
colestiramina, 845f
Collins, Francis S., 343
Collip, J. B., 901r
combustible, almacenamiento de, en homopolisacáridos, 255-267, 256f
compactina, 845r-846r
compartir genes, 627r
complejo de escisión del agua, **768**, 769
complejo de inicio, 1093, 1093f
complejo de la glicina descarboxilasa, **787**, 787f
complejo de la nitrogenasa, **855**
fijación de nitrógeno por, 855-860, 858f, 859f, 860f
complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), **618**
canalización de sustratos en, 620-621, 621f
coenzimas de, 619, 619f, 620f
enzimas de, 619-620, 620f
reacción de descarboxilación oxidativa de, 618-619, 619f
regulación alostérica y covalente de, 637-638, 638f
complejo de la α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, 699f, **700**, 701
complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa, **626**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 626-628, 628f
regulación de, 638f, 639
complejo de liberación de oxígeno, **768**
actividad de escisión del agua por, 768, 769f
estructura de, 769f, 769
complejo de preinicio (PIC), 1140f, **1144**
complejo de reconocimiento del origen (ORC), **995**$_n$, 995f
complejo de translocación de péptido, **1106**, 1107f
complejo del citocromo b_6f
flujo electrónico cíclico con, 765-766
funciones duales de, 772, 773f
unión de PSI y PSII con, 765
complejo del citocromo bc_1, 713t, 714f, **716**, 716f, 717, 717f
de las bacterias púrpura, 759, 760f
en cianobacterias, 772-773, 773f
complejo del poro de la transición de la permeabilidad (PTPC), **741**, 742f
complejo enzima-sustrato (ES)
efectos de velocidad de, 201-202, 201f
cuantificación de, 202-203, 203f
entropía de, 53, 53f
interacciones débiles en
energía de fijación de, **195**
especificidad a partir de, 197-199, 198f
optimización del estado de transición de, 195-196, 196-197, 196f, 197f
K_s de, 206 sitio activo en, 158, 192, 192f
complejo ES. *Véase* complejo enzima-sustrato
Complejo I, **714**, 713t, 714-715, 714f, 716t
Complejo II, 713t, 714f, **715**, 716, 716f
Complejo III, 713f, 714f, **716**, 716f, **717**, 717f
Complejo IV 713t, 714f, **717**, 718, 718f
en condiciones hipóxicas, 736f, 738-739
complejo ternario, 207-208, 207f
Complejo V. *Véase* ATP sintasa
complejos de captura de la luz (LHC), **756**
complejos de Golgi, **7**, 8f
complejos multienzimáticos. *Véase también complejos específicos*
en el ciclo de la urea, 682
en el ciclo del ácido cítrico, 638-639, 639f
en la cadena respiratoria mitocondrial,
Complejo I, 713-715, 713t, 714f, 715t
Complejo II, 713t, 714f, 715-716, 716f
Complejo III, 713t, 714f, 716-717, 716f, 717f
Complejo IV, 713t, 714f, 717-718, 718f, 738-739
en respirasomas, 718-719, 719f, 720r-721r
microscopía crio-electrónica de, 720r-721r
complejos pre-replicativos (pre-RC), **994**
complejos snoRNA-proteína (snoRNP), 1048, 1050f
complementariedad, de hebras de DNA, 31, 31f, 289, 289f
compuestos fosfato de alta energía, 510-513, 512f
compuestos fosforilados
de alta energía, 511-513, 512f
variación de energía libre de hidrólisis, 509-510, 509f, 510f, 511f, 511t
condensación aldólica, **503**, 503f
condensación de Claisen, **503**, 503f
como primer paso en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 624-625, 624f, 625f
como primer paso en la síntesis de ácidos grasos, 809f, 809-810
condensinas, 974, 973f, 974f
condiciones hipóxicas, fermentación de piruvato en, 536
ácido láctico, 537, 537f, 552-553, 554r
alimentos y productos químicos industriales producidos por, 555-557
etanol, 537, 537f, 553, 563f, 556r
tiamina pirofosfato en, 555, 555f, 556t
condroitina sulfato, **261**, 261f, 264f, 266
en agregados de proteoglucanos, 266-267, 267f
conductor, **1132**, 1133f
conectores, 323f, **323**
configuración absoluta, **78**
de aminoácidos, 78, 78f
configuración, **16**, 16f, 17-19, 17f, 18f
conformación nativa, **31**, **116**
conformación β, 121t, **123**, 123f
conformaciones, **19**, 19f, **116**
cambios de encaje inducido en, 198
cambios propulsados por ATP en, 510-511
de enzimas alostéricos, 228-229, 228f, 229f
de GLUT1, 409, 410f
de la hemoglobina, 164, 165f, 166f, 167f
de las unidades β de la ATP sintasa, 729, 730f
de proteínas, 31
interacciones débiles que estabilizan, 116-118
del anillo de piranosa, 248, 248f del DNA, 290-291, 290f
en homopolisacáridos, 258-259, 258f, 259f
conservación de la energía, 496
constante de asociación (K_a), **160**, 160f, 161
constante de Boltzmann, **194**
constante de disociación (K_d), **160**, 160f, 161-162, 161t
del complejo ES, 205 para la mioglobina y oxígeno, 160f, 162
constante de equilibrio (K_{eq}), 25-27, **58**, **194**
de enzimas metabólicos, 578-579, 579t
de la ionización del agua, 59, 60
definición termodinámica de, 194, 195t
denotación de, 160 K_a, 160, 160f, 161
K_d, 160-162, 160f, 161t
naturaleza multiplicadora de, 501
relación del cambio de energía libre con, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
constante de equilibrio estándar (K'_{eq}), **497**
naturaleza multiplicadora de, 501
relación del cambio de energía libre estándar con, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
constante de especificidad, 206t, **206**
constante de Michaelis (K_m), **203**, 203f
comparación entre enzimas mediante, 206, 205t
determinación de, 203, 204r, 206
efectos de inhibidores reversibles sobre, 211-212, 211t
interpretación de, 203-206, 204t, 205t
regulación metabólica y, 576f, 577, 577f
constantes de disociación ácida (K_a), **61**, 61f
constantes de ionización, **61**
constantes de velocidad, **194**
denotación, 194
k_{cat}. *Véase* k_{cat}
relación de la energía de activación con, 194
constantes estándar transformadas, **497**
constitutivos (housekeeping), 39, 1120
constructo de referencia, 336
consumo de alcohol
deficiencia de niacina y, 524
deficiencia de tiamina y, 568, **621**
consumo energético, regulación de. *Véase* regulación de la masa corporal
contenido de energía libre (G), **23**, 496
en sistemas biológicos, 496-497
fuentes celulares de, 497
contigos, **311**
continuidad genética, 30-31
contracción
energía del ATP para la, 510-511, 514
metabolismo muscular para 915-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
proteínas motoras implicadas en
interacciones de, 183, 182f, 183f
miosina y actina, 180-181, 180f
proteínas que organizan los filamentos delgados y gruesos, 182-183, 181f
regulación de, 183, 183f, 451-453
contracción muscular
efectos de la insulina sobre, 923, 924f, 923t
energía del ATP para, 511, 514
funciones metabólicas del, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
glucógeno en, 599
isozimas de la hexoquinasa en, 588-589, 588r, 589f
metabolismo muscular para, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
proteínas motor implicadas en,
interacciones de, 183, 182f, 183f

miosina y actina, 179-180, 180f
proteínas organizadoras de los filamentos delgados y gruesos, 183-183, 181f
regulación de, 183, 183f, 451-453
regulación glucídica en, 609-611, 610f, 611f
transporte de amoníaco desde, 680, 681f
contraceptivos, mifepristone, 474
control combinatorio, **1129**, 1141, 1142f
control metabólico, **578**
control por aceptor, **737**
convenciones sobre nomenclatura. 980
conversión interna, centros de reacción fotoquímicos y, 761-762
cooperatividad, 438,
de la transducción de señales, 437-438, 438f
corazón
efectos del NO sobre, 466
plasmalógenos en, 367, 367f
tejido muscular del. *Véase* músculo cardíaco
Corey, Robert, 118, 120-123
Cori, Carl F., 604, 606r
Cori, Gerty T., 604, 606r
corismato, en biosíntesis de aminoácidos, 870-871, 870f, 871f, 872f, 873f
Cornforth, John, 833
corrección de pruebas, **985**
en ribosomas, 1097
por aminoacil-tRNA sintetasas, 1085-1087
corte y empalme (splicing) alternativo, **1046**, 1046f, 1047, 1047f
corte y empalme de RNA, **1039**
corticosteroides, 905
corticotropina. *Véase* hormona adenocoticotrópica
cortisol, 905, 908, 909f, **930**
como derivado del colesterol, 374, 374f
regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por, 823, 824f
señalización del estrés por, 930
cotransportador 1 Na^+-K^+-2Cl^-, **681**
cotransportador acil-carnitina/carnitina, **651**, 632f
cotransportador antiparalelo (antiport), **412**, 412f
cotransportador paralelo de Na^+-glucosa, **421**, 421f, 422f
cotransportadores impulsados por protones, transportador de lactosa, 419, 421, 421f
cotransporte paralelo (symport), **412**, 412f
gradientes iónicos proporcionan energía para, 418-422, 418t, 421f, 422f
cotransporte paralelo (uniport), **412**, 412f
Coumadin. *Véase* Warfarina
COX-1. *Véase* ciclooxigenasa 1
COX-2. *Véase* ciclooxigenasa-2
COX. *Véase* ciclooxigenasa
COX4-1, 738f, 738
COX4-2, 738f, 738
cpDNA. *Véase* DNA de cloroplastos
CPT1. *Véase* carnitina palmitiltransferasa 1
CPT2. *Véase* carnitina palmitiltransferasa 2
Crassulaceae, fotosíntesis en, 792
CRE. *Véase* elemento de respuesta a cAMP
creatina fosfato. *Véase* fosfocreatina
creatina quinasa, **515**, **686r**
en músculo, 916-917, 918f, 918r-919r
ensayo de daño tisular utilizando, 686r
creatina, **878**
biosíntesis de, 878, 879f
en músculo, 916-917, 918f, 918r-919r
creatinina, 918r-919r
CREB. *Véase* proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
crecimiento, regulación de la ruta mTORC1 de, 936-937, 937f, 938f
cremallera de leucina, **1128**, 1129f
Crick, Francis, 97, 949, 1070
estructura de DNA según, 286-290, 289f, 290f, 981
hipótesis del mundo RNA propuesta por, 1062-1064
hipótesis de balanceo (*wobble*) según, 1076-1077, 1076f, 1007t
criomicroscopia electrónica, 720r, 721r
criptocromos, **525**
cromátida hermana, 1011-1012, 1013f
cromátida, hermana, 1011-1012, 1013f
cromatina, **966**
contenido de la, 966-967, 966f, 967f
nucleosomas como unidades fundamentales de, 967-969, 968f, 969f, 970r-971r
transcripcionalmente activa comparada con inactiva, 1140-1141, 1141t
cromatóforos, **770**
cromatografía
análisis de glúcidos utilizando, 274
de lípidos, 381, 381f
de proteínas, 89-90, 90f, 91f, 92
etiquetas para, 331, 332t, 332f
cromatografía de afinidad, **92**
de proteínas, 91f, 92
etiquetas para, 331, 332f, 332t
cromatografía de exclusión de tamaño, **90**
de proteínas, 91f, 92
cromatografía de gases (GC), de lípidos, 381, 380f
cromatografía de intercambio catiónico, **89**
de proteínas, 89, 91f
cromatografía de intercambio iónico, **90**
de proteínas, 90, 91f
cromatografía en capa fina (TLC), de lípidos, 380, 380f
cromatografía en columna, **89**
análisis de glúcidos utilizando, 274
de lípidos, 380, 380f
de proteínas, 89-90, 90f, 91f, 92
cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), **92**
cromosomas artificiales de levadura (YAC), **326**, 957
como vectores de clonación, 326-327, 327f
cromosomas artificiales,
bacterianos, 325, 326f
de levadura, 326-327, 327f, 957
humanos, 957
cromosomas bacterianos artificiales (BAC), **325**
como vectores de clonación, 325-326, 326f
cromosomas humanos artificiales (HAC), 957
cromosomas, **951**
aneuploides, 1014r
artificiales,
bacterianos, 325-326, 326f
de levadura, 326-327, 327f, 957
humanos, 957
bacterianos
artificiales, 325-326, 326f
elementos de, 952-953, 954f, 954t
estructura de, 974-975, 974f, 975f
estructura del
cambios en el ciclo celular en, 960, 960f
cromatina, 966-968, 966f, 967f, 968f, 969f, 970r-971r, 1140-1141, 1141t
en bacterias, 975, 975f
estructuras muy condensadas, 969-973, 972f, 973f
histonas, 966-969, 967f, 967t, 968f, 969f, 970r-971r, 1140-1141, 1141t
nucleosomas, 966-975, 967f, 968f, 969f, 970r-971r, 972f, 973f
proteínas SMC, 974-975, 973f, 974f
eucarióticos 953-955, 954t, 955f
complejidad de, 956-957, 956f, 957t
genes de, 951-952, 952f
localización de enfermedad génica en, 349-351, 351f
mitocondriales, 741-742, 742t, 743f
movimiento de, 179-180
replicación completa de, 1017-1018, 1018f
segregación de, 1014r
superenrollamiento en, 967, 967f, 968f
números de enlace que describen, 959-961, 960f, 961f
plectonémico y solenoidal, 964, 965f, 966f
replicación y transcripción y, 967, 968f
subenrollamiento de, 958-961, 959f, 960f, 961f
topoisomerasas que modifican, 981-963, 962f, 963f, 963t, 964r-965r
víricos, 951-952, 951f, 953t
CRP. *Véase* proteína receptora de cAMP
cruciforme, **292**
en el DNA 292-293, 291f
CTD. *Véase* dominio carboxilo terminal
CTF1, 1146, 1147f
CTP. *Véase* citidina trifosfato
cuantificación, de proteínas, 94-95, 96f
cuanto, **754**
cuerpos cetónicos, 545- 548, 914, 914f
conversión de aminoácidos a, 688f, 688
degradación de ácidos grasos a, 666-667, 667f, 668f
en diabetes mellitus, 687, 688f, 930
en inanición, 667-668, 668f
cuerpos de Lewy, 150
cumarinas, 964r
cumericina A1, 964r
curare, 430
curva de saturación sigmoidea, de enzimas alostéricos, 229-230, 230f
curva de unión sigmoidea, para el oxígeno, 166, 166f
curvas de titulación, **62**, 62f, 63, 63f
de aminoácidos, 81-85, 83f, 84f, 85f
curvatura, de membranas, procesamiento biológico que utiliza, 403-405, 403f, 404f

D

D-aminoácido oxidasa, 692
D-aminoácidos, utilización por las bacterias de, 879
D-β-hidroxibutirato deshidrogenasa, 666, 667f
D-β-hidroxibutirato, **666**, 666s
en diabetes mellitus, 930-931
formación y uso de, 666-667, 667f, 668f
Dalton, John, 458r
daltons, 13r
Dam metilasa, 989t, 990
en reparación de apareamientos incorrectos, 998
Dam, Henrik, 378
Darwin, Charles, 1158r
Dayhoff, Margaret Oakley, 76
DBRP. *Véase* proteína reconocedora de la secuencia de destrucción
DCCD. Véase diciclohexilcarbodiimida
dCDP. *Véase* desoxicitidina difosfato
DDI. *Véase* didesoxiinosina
ddNTP. Véase didexosinucleósidos trifosfato
de inmunoglobulinas, recombinación de, 1020-1021, 1020f, 1021f
dedo de zinc, 1127, 1127f
deficiencia de HDL familiar, **844**, 844f
deficiencia de yodo, **906**, 906f
degradación de Edman, **97**, 98-99, 99f
ΔG. *Véase* cambio de energía libre,
$\Delta G'^{\circ}$. *Véase* cambio de energía libre estándar bioquímica
$\Delta G^{\ddagger}$. *Véase* energía de activación
ΔG_B. *Véase* energía de fijación
ΔG°. *Véase* cambio de energía libre estándar
ΔG_p. *Véase* potencial de fosforilación
demencia frontotemporal, plegamiento proteico incorrecto en, 150
dendrotoxina, 430, 472
densidad superhelicoidal (σ), **960**, 961
derivados de esfingosina, como señales intracelulares, 372-373
derivados de hidrocarburos, ácidos grasos como, 359-362, 360t, 361f
dermatán sulfato, **261**
desacilación, en el mecanismo de la quimotripsina, 216-217, 220, 216f, 217f, 218f-219f
desaminación oxidativa, **678**
del glutamato, 678-680, 680f
desaminación, de nucleótidos, 298-300, 298f, 300f
desaminasas inducidas por activación (AID) **1078**, 1079
desarrollo,
cascada de proteínas reguladoras en el, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
desaturación, de ácidos grasos saturados, 815, 815f, 816r-817r, 818
descarboxilación oxidativa, **618**
del piruvato en el complejo PDH 618-619, 619f
mecanismo enzimático conservado en, 628, 628f
descarboxilaciones, 503, 503f
desensibilización, **438**
de los receptores β-adrenérgicos, 448-449, 448f, 449f
en la transducción de señal, 438f, 439
desfosforilación, 629r
de la glucógeno sintasa, 607-608, 608f
en la regulación metabólica, 578, 578f
deshidratación
del 2-fosfoglicerato, como paso 9 en la ruta glucolítica, 536f, **544**
en la síntesis de ácidos grasos, 809f, 810
deshidrogenación, **519**
en oxidaciones biológicas, 518-519, 518f
deshidrogenasas unidas a nucleótido de nicotinamida, **709**
deshidrogenasas, **519**
acciones del NADH y NADPH con, 522-523, 522f, 523f
en la cadena respiratoria mitocondrial, 708-710, 710t
desmina, **182**
desmosina, **81**, 82s
desnaturalización, **143**
de ácidos nucleicos, 295-298, 297f

Copy Station

de proteínas, 142, 143f
pérdida de función con, 143-144, 143f
renaturalización después de, 144, 144f
desnitrificación, **854**, 854f
desolvatación, **198**
por enzimas, 198
desoxiadenilato, 283s
desoxiadenosina, 283s
desoxicitidilato, 283s
desoxicitidina difosfato(dCDP), síntesis de timidilato a partir de, 890, 891f
desoxicitidina, 283s
desoxiguanilato, 283s
desoxiguanosina, 283s
desoxihemoglobina, **164**, 165f
estructura de, 142f
unión de BPG a, 172, 172f
desoxirribonucleótidos, **31**, **283**, 283s, 284
biosíntesis de, 887-890, 888f, 889f, 890f
desoxirrubicina (Adriamicina), 965r
resistencia tumoral a, 418
desoxitimidilato, 283s
desoxitimidina, 283s
desoxiuridina monofosfato (dUMP), síntesis de timidilato a partir de, 890-891, 891f
desplazamiento de marco en la traducción, **1077**, 1077f, 1078-1079, 1078f, 1079f
desplazamiento de marco, 1077-1079, 1077f, 1078f, 1079f
desplazamiento nucleofílico, 505-506, 505f
en reacciones con ATP, 513-514, 513ff, 515r
utilización por la lisozima de, 223-225, 223f, 224f
desplazamientos nucleofílicos S_N2, 504-506, 505f
en reacciones del ATP, 513-514, 513f, 515r
despolarización, de neuronas, 471, 472f
despurinación, de nucleótidos, 298-299, 298f
destinos metabólicos de los grupos amino, 674, 675f
degradación enzimática de las proteínas de la dieta, 675-677, 676f
liberación de amoníaco por el glutamato, 677-678, 680f
toxicidad del amoníaco y, 680-681
transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato, 677, 677f, 678f, 679f
transporte de amoníaco por la alanina, 680, 681f
transporte de amoníaco por la glutamina, 678-680, 680f
desviación del aspartato-argininosuccinato, **684**, 685f
determinante antigénico, **176**
dexametasona, regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por, 823, 824f
dextranos, **256**
enlace glucosídico en, 258f
estructuras y funciones de, 262f
evolución ligada al, 1158r-1159r
dextrinas, en las rutas alimentadoras de la glucólisis, 549
dextrosa, 243
DFMO. *Véase* difluorometilornitina
DGDG. *Véase* digalactosildiacilgliceroles
DH. *Véase* β-hidroxiacil-ACP deshidratasa
DHA. *Véase* ácido docosahexanoico
DHAP. *Véase* dihidroxiacetona fosfato
diabetes insípida, transporte defectuoso de agua en, 411r, 424
diabetes juvenil de aparición en la madurez (MODY), 597r
diabetes mellitus dependiente de insulina. *Véase* diabetes mellitus tipo 1
diabetes mellitus neonatal, 925
diabetes mellitus no dependiente de insulina. *Véase* diabetes mellitus tipo 2
diabetes mellitus tipo 1, 597r-598r, **930**
defectos de insulina en, 930-931
glucólisis en, 548, 548f
insulina para, 901r
transporte defectuoso de glucosa en, 411r, 545-548, 548f
diabetes mellitus tipo 2, 597r, **930**, **941**
defectos de insulina en, 930-931
gestión de,
biguanidas, 943, 943t
cirugía, 942-943, 943t
dieta y ejercicio, 942-943, 943t
glifozinas, 423
sulfonilureas, 924-925, 942, 943t
tiazolidinadionas, 823, 941-943, 943t
obesidad asociada a, 941, 942f
papel de SCD en, 815
resistencia a la insulina en, 941, 942f
diabetes mellitus, **930**
acidosis en, 67-68, 67f, 68r, 667-668, 930
defectos de insulina causantes, 930-931
defectos mitocondriales causantes, 745-746
medición de la glucosa sanguínea en, 250r-251r
metabolismo de combustible en incontrolada, 927-929, 927t, 928f, 929f
MODY, 597r
neonatal, 925
plegamiento incorrecto de proteínas en, 149
producción de cuerpos cetónicos en, 667-668, 668f, 930
síntesis de triacilgliceroles en, 822, 822f
tipo 1. *Véase* diabetes mellitus tipo 1
tipo 2. *Véase* diabetes mellitus tipo 2
diacilglicerol 3-fosfato, 366f, **820**
glicerofosfolípidos como derivados de, 365-366, 365f, 366f
síntesis de, 820-821, 821f
diacilglicerol, **450**
como señal intracelular, 372
como segundo mensajero, 450-451, 451t, 454f
diagrama de coordenada de reacción, 192, 192f, 193f
para la ATP sintasa, 729, 729f
diagrama de perspectiva, **16**, 16f
diagrama topológico, 140f, **141**
diálisis, **89**
diastereómeros, 17, 18f
diazótrofos, fijación del nitrógeno por, 855-860, 858f, 859f, 860f
diciclohexilcarbodiimida (DCCD), 715t
dicloroacetato, inhibición de la piruvato deshidrogeasa quinasa por, 638
dicromatos rojos, **457**
dicromatos verdes, **457**, 458r
didesoxiinosina (DDI), 1059r
didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTP), 303-304, 304f, 305, 305f
dienos conjugados, lipídicos, 379, 378f
dieta
gestión de la diabetes mellitus tipo 2 con, 942-943, 943t
regulación de la masa corporal por la, 937-938, 937f, 938f
diferencia específica de enlace, **960**, 961
diferenciación celular **575**
diferenciación, celular, 575, 1157-1160, 1157f, 1160f
difluorometilornitina (DFMO), 213r-214r
DIFP. *Véase* diisopropilfluorofosfato
difracción por rayos X
del DNA, 288, 288f
determinación de la estructura de proteínas mediante, 134r-135r
difusión
de lípidos de la membrana,
a saltos, 400, 400f
flip-flop, 398-399, 399f
lateral, 398-401, 399f, 400f, 401f
de solutos a través de membranas, 406-407, 406f, 407f
dimensiones celulares y, 3-4, 4f
difusión facilitada, **406**
difusión flip-flop, de lípidos de membrana, 398-399, 399f
difusión lateral, de lípidos de membrana, 398-401, 399f, 400f, 401f
difusión por saltos, de lípidos de membrana, 400, 400f
difusión simple, **406**, 406f
digalactosildiacilgliceroles (DGDG), 367f
digestión
de grasas, 648-649, 648f, 649f
de proteínas, 675-677, 676f
digesto parcial, 323
dihidrobiopterina reductasa, **696**, 697f
dihidrofolato reductasa, 196f, **890**
en la síntesis de timidilato, 890, 891f
inhibición de, 893, 895f, 894-895
dihidrolipoil deshidrogenasa, **619**, 620, 620f
canalización de sustrato de la, 620-621, 621f
dihidrolipoil transacetilasa, **619**, 620, 620f
canalización de sustrato de la, 620-621, 621f
dihidroorotasa, **886**, 886f
dihidroorotato deshidrogenasa, **720**
transferencia de electrones por, 719f, 720
dihidrouridina, 1048f
dihidroxiacetona fosfato (DHAP), **540**
en el ciclo de Calvin, 781f, 782f, 778-779
sistema de cotransporte antiparalelo P_i-triosa fosfato y, 781-783, 783f
en la ruta glucolítica, 535f, 536, 536f, 539, 541f, 542f
en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, 820, 821f
dihidroxiacetona, 244, 244s, 246s
diisopropilfluorofosfato (DIFP), 212f
dímeros de pirimidina, 299, 299f
reparación por la fotoliasa de, 1002-1003, 1003f
dímeros, pirimidina, 299, 299f
dimetil-lisina, 1102f
dimetilalil pirofosfato, **832**
en la síntesis de colesterol, 831-832, 832f
dimetilsulfato, 300, 300f
dinamina, **1111**, 1111f
dineínas, 179
dinitrogenasa reductasa, 230, **855**, 858-860, 858f, 859f
dinitrogenasa, 855, 858-860, 858f, 859f
Dintzis, Howard, 1089, 1089f
dióxido de carbono (CO_2)
biotina como transportador de, 635-637, 636f, 637f
cambio climático y, 788r-789r
como tampón. *Véase* sistema tampón de bicarbonato
oxidación de la glucosa a. *Véase* oxidación de la glucosa
oxidación del isocitrato a, 623f, 625-626, 628f
oxidación del α-cetoglutrato a, 623f, 626-628, 628f
transporte por la hemoglobina de, 170-171, 170f
dioxigenasas, **816r**
dipolo, de una hélice α, 122, 122f
direccionado (*targeting*) de proteínas
de proteínas nucleares, **1109**, 1110f
en bacterias, 1109-1111, 1110f, 1111f
endocitosis mediada por receptor en, 1111-1112, 1111f, 1112f
glucosilación en, 1106-1109, 1107f, 1108f
modificación postraducción en el retículo endoplasmático, 1105-1106, 1106f, 1107f
direccionamiento, de proteínas,
de proteínas nucleares, 1109, 1110f
en bacterias, 1109-1111, 1120f
endocitosis mediada por receptor en, 1111-1112, 1111f, 1112f
glucosilación en, 1106-1109, 1106f, 1107f, 1109f
modificación postraducción en el retículo endoplasmático en, 1105-1106, 1106f,1107f
disacáridos, **243**, 245
en rutas alimentadoras de la glucólisis, 549, 549f
enlace glucosídico en, 252-253, 252f, 253t, 253f
nomenclatura de, 252-253, 253t
sabor dulce de, 254r-255r
disco Z, 181f, **182**, 183
diseño racional de fármacos, inactivadores suicidas en, 212, 213r-214r
disfunción eréctil, inhibidores de la PDE para, 466
disolvente, agua como. *Véase* soluciones acuosas
disolventes
para la extracción de lípidos, 380, 380f
propiedades coligativas de, 55-56, 56f
punto de fusión, punto de ebullición, y calor de vaporización, 48t
disruptores endocrinos, 905
divicina, 566r
DNA circulares cerrados, **958**
DNA complementarios, **335**, 335f, 336, 337f, 338f, **1057**
DNA cruciforme, 961-962, 961f
DNA de cloroplasto (cpDNA), 955
DNA de secuencia simple, **956**
DNA fotoliasas, 998t, 1002-1003, 1003f
DNA girasa, 989t, 992t
DNA glucosilasas, **1000**
DNA helicasa II, 999
DNA ligasas, **321**, 524, **987**, 992t
DNA recombinante a partir de, 320-324, 321f, 321t, 322t, 323f
en el traslado de mella, 989
en reparación de apareamientos incorrectos, 999
DNA mitocondrial (mtDNA), 953-955, 955f
variaciones en el código genético de, 1074r
DNA no codificante, en el genoma humano, 346
DNA polimerasa I, **983**
corrección de pruebas por, 985, 986f

COPY STATION

descubrimiento de, 983
en el traslado de mella, 986f, 987
fragmento grande (Klenow) de, 987
funciones de, 985-986, 992t
DNA polimerasa II, **986**, 987f
DNA polimerasa III, **986**, 987, 987f
en elongación, 990-993, 992f
en la reparación de apareamientos incorrectos, 999
funciones de, 992t
subunidades de, 988f, 988t
DNA polimerasa IV, 987t, 1005
DNA polimerasa V, 987t, 1005
DNA polimerasa α, **996**
DNA polimerasa β, 1005
DNA polimerasa δ, **996**
DNA polimerasa ε, **996**
DNA polimerasa η, 1005
DNA polimerasa ι, 1005
DNA polimerasa λ, 1005
DNA polimerasas dependientes de RNA. *Véase* transcriptasas Inversas
DNA polimerasas, **983**
actividad exonucleasa 5'⟶3' de, 987, 986f
actividad exonucleasa 3'⟶5' de, 985, 986f
cebador en, 984, 984f
corrección de pruebas por, 984-985, 986f
dependientes de RNA. *Véase* transcriptasas inversas
disociación y reasociación de, 984
en la secuenciación del DNA, 303-305, 304f, 305f
en PCR, 301-303, 303f
en reparación por excisión de base, 1005
en replicación, 983-987. *Véase también* replicación del DNA
en bacterias, 981-987
en eucariotas, 996
en traslado de mella, 986f, 987
funciones de, 985-987, 992t
mecanismos de reacción de, 984f
molde para, 983, 984f
procesividad de, 984
propiedades de, 987t
tipos de, 985-987, 987t, 988t
vírica, 996
DNA primasas, **987**, 989t,990, 991f, 992t
DNA recombinante, **320**
adaptaciones de la PCR para, 333, 333f, 334f
endonucleasas de restricción y DNA ligasas que producen, 320-324, 321f, 321t, 322t, 323f
producción de proteínas mediante etiquetas para la purificación de, 331-333, 332f, 332t
genes y proteínas alterados, 330-331, 331f
sistemas bacterianos utilizados en, 328, 329f
sistemas de células de mamífero utilizados en, 329-330
sistemas de insectos y virus de insectos utilizados en, 329, 330f
sistemas de levaduras utilizados en, 329
vectores de expresión para, 327-328, 328f
vectores de clonación para
BAC, 325, 326f
expresión, 328, 328f
plásmidos, 324-325, 324f, 325f
YAC, 326-327, 327f
DNA relajado, **957**, 958f
DNA satélite, **956**
DNA triplex, **292**, 292f
DNA-PKcs, 1016, 1016f
DNA. *Véase* ácido desoxirribonucleico
DNasas, **983**
DNP. *Véase* 2,4-dinitrofenol
doble hélice
DNA, 287-289, 286f, 289f, 290f
desnaturalización y fusión, 295-296, 297f
desenrollamiento de, 982, 982f
RNA-DNA, 1028f, 1029
doble hélice RNA-DNA, 1028f, 1029
dobles enlaces, en ácidos grasos, 359-361
dodecil sulfato sódico (SDS), 93f, **92**, 94f, 95f
Doisy, Edward A., 378
dolicoles, 377f, **379**
dominio carboxilo terminal, 1034
dominio de activación ácidico, **1146**, 1146f
acidosis, 61, 668
cuerpos cetónicos que producen, 667-668, 930
efectos de, 68r
en diabetes mellitus, 67-68, 67f, 68r, 668, 930
grupos R ácidicos, 79f, 81
metabólica, 680
dominio de activación rico en prolina, **1146**, 1147
dominio de homología de la pleckstrina (PH), 468
en proteínas anfitrópicas, 397
dominio de homología de Src (SH2), **461**, 467
sobre Grb2, 461, 462f
sobre PI3K, 463, 463f
sobre proteínas anfitrópicas, 397
dominio de unión de nucleótido (NBD), de los transportadores ABC, 417, 417f
dominio F_1
de la ATP sintasa, 727
estabilización del ATP por, 728, 728f
estructura y conformciones de, 729, 730f
dominio F_o
de la ATP sintasa, 727-728
estructura y conformaciones de, 729, 730f
flujo de protones a través del, movimiento rotatorio producido por, 731-733, 732f, 733r, 733f
dominio PH. *Véase* dominio de homología a pleckstrina
dominio rico en glutamina, **1146**,1147f
dominio SH2. *Véase* dominio de homología de Src
dominio SH3, 468
dominios BAR, **403**
curvatura de membrana y, 403, 403f
dominios de interacción proteína-proteína, de proteínas reguladoras,
dominios de unión al DNA, de proteínas reguladoras, 1125-1128, 1125f, 1126f, 1127f, 1128f
dominios de unión de fosfotirosina (dominios PTB), **467**, 467f
dominios PTB. *Véase* dominios de unión de fosfotirosina
dominios, **137**
de activadores de la transcripción, 1145-1146, 1147f
de interacción proteína-proteína, 1128-1130, 1129f
de organismos vivos, 4-5, 4f
de proteínas globulares, 137-138, 137f
de unión al DNA, 1125-1128, 1125f, 1126f, 1127f, 1128f
dopamina, **880**, 881f
Drosha, 1061f
Drosophila melanogaster, regulación del desarrollo, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
DUE. *Véase* elemento de desenrollamiento del DNA
dulzor, de los azúcares, 254r-255r
dUMP. *Véase* desoxiuridina monofosfato

E

E. *Véase* potencial de reducción
E°'. *Véase* potencial de reducción estándar
E2F, en regulación del ciclo celular, 478, 480, 479f
ECM. *Véase* matriz extracelular
ecuación de equilibrio, **160**
para la unión reversible proteína-ligando, 160-162, 160f, 161t
ecuación de Henderson-Hasselbalch, **64**
ecuación de Hill, **167**
ecuación de Lineweaver-Burk, 204r
ecuación de Michaelis-Menten, **203**, 203f
en reacciones bisustrato, 206-208, 207f
para un inhibidor acompetitivo, 212
para un inhibidor competitivo, 210
para un inhibidor mixto, 211
transformaciones de, 204r
ecuación de Nernst, 520
ecuación de velocidad, **192**, **203**
Michaelis-Menten, 203
ecuaciones químicas, ecuaciones bioquímicas comparadas con, 506-507
edición del RNA, **1078**
antes de la traducción, 1077-1079, 1077f, 1078f
Edman. Pehr, 97, **99f**
edulcorantes artificiales, 254r-255r
efecto Bohr, **170**
efecto hipercrómico, 94
efecto hipocrómico, 297
efecto invernadero, 788r-789r
efecto termodinámico, de las concentraciones de ATP, 580
efectores alostéricos, **228**
en la regulación metabólica, 576f, 578, 578t
efectores, **1122**
efectos estéricos, plegamiento de homopolisacáridos y, 258-259, 258f, 259f, 260f
efectos hidrofóbicos, **52**, **116**
en interacciones lectina-glúcido, 273, 273f
en la formación de membranas, 389
en la unión de proteínas integrales de membrana, 393-394, 393f, 394f
en procesos de plegamiento de proteínas, 145
estabilidad proteica y, 116-118
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-260, 258f, 259f, 260f
EGFR. *Véase* receptor del factor de crecimiento epidérmico
ejercicio, gestión de la diabetes mellitus tipo 2 con, 942-943, 943t
elaboración de cerveza, fermentación etanólica en, 553, 553f, 556r
elastasa de neutrófilo, 233
elección de sitio poli(A) y, 1047, 1047f
elección del sitio poli(A), 1047, 1047f
electrófilos, 218f, **502**
biológicos, 502, 502f
electroforesis bidimensional, **94**, 95f
electroforesis sobre gel de campo pulsado, **327**
electroforesis sobre gel. *Véase* electroforesis
electroforesis, **92**
de proteínas, 92-94, 93f, 94f, 95f
de campo pulsante, 327
electrones, producción por el ciclo del ácido cítrico de, 631-633, 633f, 633t
electroporación, **325**
elemento de desenrollamiento del DNA (DUE), **989**
elemento de respuesta al cAMP (CRE), **1149**
elementos de respuesta a hormonas (HRE), **473**, **1147**, 1148f, 1149, 1149f, 1149t
elementos de respuesta al hierro (IRE), **626r**, 627r
elementos de respuesta, **575**
en la regulación metabólica, 575, 576f
elementos diseminados cortos (SINE),1079
elementos químicos, 12, 12f
elementos, químicos, 12, 12f
eliminación de agua, cambios de energía libre estándar, 499t
eliminación del casquete, 1040- 1041
Elion, Gertrude, 893, 895, 996
elipticina, 965r
ELISA. *Véase* ensayo por inmunosorbente ligado a enzima
Elk1, en señalización por INSR, 462, 462f
elongación, **1095**
en síntesis de proteínas, 1080f, 1080-1081, 1081t, 1095
corrección de pruebas durante, 1097
formación del enlace peptídico, 1096, 1097f
translocación, 1096-1097, 1098f
unión de aminoacil-tRNA, 1095-1096, 1095f
elongina (SIII), 1036t, 1037f
Elvehjem, Conrad, 524
Embden, Gustav, 534
embrión, regulación del desarrollo en, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
en el genoma humano,345,-346, 346f
en la ω-oxidación 664-665, 665f
en regulación cis, 1136-1138, 1136f, 1137f
en regulación trans, 1136-1138, 1136f, 1137f
enantiómeros, **17**, 18, 18f, 18r, **76**, **244**
aminoácidos como, 76, 78, 78f
monosacáridos como, 244-245, 245f, 246f
encaje inducido, **157**, **198**
de la hexoquinasa, 221-222, 221f
encefalomiopatías mitocondriales, **744**, 745
encefalomiopatías, mitocondrial, 744-745
encefalopatía espongiforme bovina (BSE), 150r-151r
encefalopatías espongiformes 150r-151r
Endo, Akira, 845r-846r
endocannabinoides, **939**, 939f
endocitosis facilitada por receptor, **839**
de ésteres del colesterol, 838-839, 840f
de proteínas, 1111-1112, 1111f, 1112f
endocitosis, **8**
de ésteres del colesterol, 838-839, 840f
de proteínas, 1111-1112, 1111f
endonucleasas de alojamiento, 323
endonucleasas de restricción tipo II, **322**, 322t
endonucleasas de restricción, **321**
DNA recombinante a partir de, 320-324, 321f, 321t, 322t, 329f
tipo II, 322, 322t
endonucleasas, **983**

COPYSTATION

en reparación de apareamientos incorrectos, 998-1000
SP, 1001
endorribonucleasa, 1053
endosimbiosis, **37**
evolución eucariótica a través de, 36-37, 38f, 742-743, 743f
endotoxina, 269
energía
a partir del flujo electrónico, 21
almacenamiento de
en homopolisacáridos, 255-256, 256f
en triacilgliceroles, 362-363, 362f
en ceras, 363-364, 364f
cambios de en las reacciones químicas, 28, 27f, 192-194, 192f, 193f, 197f
conservación de, 496
en fotones, 754-755
en sistemas biológicos, *véase* bioenergéticos
nucleótidos como portadores de, 311-312, 311f
para crear y mantener orden, 22-24, 22r-23r, 24f
para el transporte activo contra gradiente de concentración o electroquímico, 414
solar, 751, 751f
transformación de, por organismos vivos, 21, 24f
energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$), **28**, **193**
de hidrólisis del ATP, 512
del paso transmembrana, 406-407, 407f
en reacciones enzimáticas, 193-194, 193f
energía de unión y, 197, 197f
relación de la constante de velocidad con, 194
energía de disociación de enlace, **48**
energía de fijación (ΔG_b), **195**
de ATP y ADP con la ATP sintasa, 728, 728f
en la catálisis enzimática
contribución de, 197-199, 198f
interacciones que crean, 196-197, 195f, 196f, 197f
en la glucólisis, 538
energía libre de Gibbs (G), 23, **496**
en sistemas biológicos, 496-497
fuentes celulares de, 497
energía química
energía luminosa a partir de, 515r
interacciones proteicas moduladas por miosina y actina, 179-182, 180f
filamentos deslizantes de 183, 182f, 183f
organización de filamentos delgados y gruesos, 182-183, 181f
nucleótidos como transportadores de, 311-312, 311f, 312f
energía solar, 751, 751f, 752f
enfermedad cardiovascular
disregulación del metabolismo del colesterol en, 843-844, 843f, 845r-846r
papel de los PUFA en, 361
papel de los ácidos grasos trans en, 363, 363f
enfermedad de Addison, 930
enfermedad de Alzheimer,
alelos apoE en, 838r
genes implicados en, 350-351, 351f
plegamiento incorrecto de proteínas en, 149, 149f
enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, 150r-151r
enfermedad de Cushing, 930
enfermedad de Huntington, plegamiento incorrecto de proteína en, 150
enfermedad de las vacas locas. *Véase* encefalopatía espongiforme bovina,
enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), **839**
enfermedad de Niemann-Pick, 371r
enfermedad de Parkinson, plegamiento incorrecto de proteínas en, 150-151
enfermedad de Refsum, **665**
enfermedad de Tangier, **844**, 844f
enfermedad de Tay-Sachs, 371r
enfermedad del jarabe de arce en la orina, 694t, **702**
enfermedad del sueño africana, 213r, 214r, 895
enfermedad genética,
acumulación anormal de lípidos de membrana, 371f
anemia falciforme, 172-174, 172f, 173f
anemia perniciosa, 661r
canales iónicos defectuosos, 419r-420r, 430-431, 430t
defectos de la transcetolasa, 668
defectos de peroxisomas, 663
defectos en el ciclo de la urea, 686-687, 687f, 686t
defectos en el metabolismo de aminoácidos, 692-702, 694t, 697f, 699f, 700r-701r
defectos en la acil graso-CoA deshidrogenasa, 662
defectos en la ubiquitinación, 1112-1113
deficiencia de ADA, 891-892
deficiencia de G6PD, 566r
enfermedad de Refsum, 665
enfermedades del almacenamiento del glucógeno, 599-600, 606r-607r
hemofilias, 236, 236f
localización de genes implicados en, 349-351, 351f
MODY, 597r
mutaciones de genes mitocondriales, 743-746, 744f, 745f, 746f
mutaciones en el canal de K+ accionado por ATP, 925
mutaciones en el ciclo del ácido cítrico, 639-640, 639f
plegamiento incorrecto de proteínas, 147-151, 149f
porfirias, 876, 878r
síndrome de Lesch-Nyhan, 892
transportadores ABC defectuosos, 417-418, 419r-420r
transporte de agua defectuoso, 411r, 423-424
enfermedad NPC. *Véase* enfermedad de Niemann-Pick tipo C
enfermedades del almacenamiento del glucógeno, 599, 606r-607r
enfermedades del almacenamiento lisosomal, 371r
enfermedades priónicas, plegamiento incorrecto de proteínas, 150r-151r
enfoque isoeléctrico, **94**, 95f
enlace glucosídico,
en disacáridos, 252-253, 252f, 253f, 253t
en homopolisacáridos, 258, 258f
enlace N-glucosilo, **252**
enlace *O*-glucosídico, **252**
enlace peptídico, **85**
formación de, 85-86, 86f, 950
durante la elongación, 1096, 1097f
naturaleza rígida y plana de, 118-119, 118f, 119f
rotura por proteasas de, quimotripsina, 215-220, 216f, 217f, 218f-219f
enlaces carbono-carbono, reacciones bioquímicas de formación o
rotura, 502-503, 503f, 504f
enlaces cruzados disulfuro, formación postraducción de, 1107
enlaces de hidrógeno, **48**
del agua, 47-50, 48f, 48t, 49f, 50f
solutos polares y, 49-50, 49f, 50f, 54, 54t
en el DNA
doble hélice, 289
DNA triplex, 292, 292f
en interacciones lectina-glúcido, 273, 273f
en la conformación β, 123, 123f
en la hélice α, 121
estabilidad proteica y, 116-118
estructura de los ácidos nucleicos y, 286, 286f
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-260, 258f, 259f, 260f
enlaces del carbono, 12-13, 13f
enlaces fosfodiéster, **284**
en ácidos nucleicos, 284-286, 285f
enlaces glucosídicos, 243, 245
enoil-ACP reductasa (ER), 809f, **810**
enoil-CoA hidratasa, 653f, **654**
Δ^3,Δ^2-enoil-CoA isomerasa, **657**, 657
enolasa, **544**
en la ruta glucolítica, 536f, 544
mecanismo de, 222-223, 222f
ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), **178**, 179f, **902**
ensayo por inmunotransferencia, **178**, 179f
entalpía (H), **23**, **496**
en sistemas biológicos, 496-497
enteropeptidasa, **676**
entrecruzamiento, 1011-1012, 1013f, 1015f
errores en, 1014r
entropía (S), 22r-23r, **22**, **496**
de disolución de sustancias cristalinas, 51, 51f
del complejo enzima-sustrato, 53, 53f
en sistemas biológicos, 496-497
segunda ley de la termodinámica y, 496-497
envejecimiento,
papel de la mitocondria en, 744
papel del telómero en, 1060
envenenamiento
metanol, 210
monóxido de carbono, 168r-169r
por toxinas que actúan sobre canales iónicos, 430-431, 472
ricina, 1104
toxina botulínica, 404-405
toxina del cólera, 443r-444r, 524
toxina diftérica, 1104
toxina tetánica, 405
envoltura celular, **6**, 6f
enzima de escisión de la glicina, 692f, 693f, **692**, **866**
enzima málico, **790**, **812**
en la ruta C_4, 789, 791f
generación de NADPH por, 811-812, 811f, 812f
enzima ramificante del glucógeno, 601-602, 603f
enzima RecBCD, 1010, 1010f
enzimas alostéricos heterotrópicos, 228-230, 230f
enzimas alostéricos homotrópicos, 228-230, 230f
enzimas alostéricos, **228**
cambios de conformación de, 228-229, 228f, 229f
estructura de, 228, 228f
propiedades cinéticas de, 229-230, 230f
enzimas con varias funciones (*moonlighting*), 626r
aconitasa como, 626r-627r
enzimas desramificadores, **550**, **599**
degradación del glucógeno por, 599, 599f
enzimas hepáticos, ensayos sobre el daño a tejidos mediante, 684, 686r
enzimas receptores, 439, 440f
enzimas reguladores, **227**
alostéricos, 228
cambios conformacionales de, 228-229, 228f, 229f
propiedades cinéticas de, 229-230, 230f
fosforilación de, 230-232, 231f, 232f, 233f, 233t, 237f
modificación covalente de, 230-231, 231f
en la regulación metabólica, 577, 577f
múltiples mecanismos utilizados por, 236-238, 237f
zimógenos, 232-233, 234f
en la coagulación de la sangre, 234-236, 234f, 235f, 236f
enzimas, **28**, **157**, 158, **180**. *Véase también enzimas específicos*
catálisis por, 28-29, 27f, 28f, 189
ácido-base, 199-200, 199f
cinética de. *Véase* cinética enzimática
covalente, 200
en el sitio activo, **192**, 192f
energía de fijación en, 196-199, 195f, 196f, 197f, 198f
especificidad de, 195-196, 195t, 197-199, 198f
papel del estado de transición en, 196-197, 195f, 196f, 197f
por ion metálico, 200
principios de, 195-196, 195t
regulación de, 575-577, 576f, 577f, 578f, 578t
termodinámica de, 194, 194t, 500
velocidad de reacción y efectos de equilibrio durante, 192-194, 192f, 193f
clasificación de, 191, 191t
coeficiente de control de flujo de, 583, 583f, 584r-585r
coeficiente de elasticidad de, 583, 584f, 584r-585r
coeficiente de respuesta de, 583-585, 585r
coenzimas de, 3, **190**
adenosina en, 313, 312f
como transportadores electrónicos, 521
ejemplos de, 190, 190t
cofactores de, 190, 506
adenosina en, 313, 312f
en la degradación de aminoácidos, 677, 677f, 678f, 679f, 688-691, 689f, 690f, 691f
iones inorgánicos que actúan como, 190, 190t
lípidos como, 377-378, 377f
como proteínas, 190
con diversas funciones (moonlighting), 626r-627r
contribuciones al flujo por,
capacidad de respuesta al cambio y, 583, 584f, 584r-585r
efectos controladores externos y, 583-585, 585r
efectos de la actividad sobre, 583, 583f, 584r-585r
medida experimental de, 582-583, 583f
cuantificación de, 94-95, 96f
en el clonaje de DNA y en la creación de DNA recombinante, 320-324, 321f, 321t, 322t, 323f
estudio histórico de, 189-190 inhibición de, 209
irreversible, 210-212, 212f, 213r-214r, 215f
por antibióticos, 225-227, 226f, 227f
por inhibidores de proteasas, 220-221, 220f, 221f
reversible, 210-212, 210f, 211r, 211t

COPY-STATION

mecanismos de
antibióticos basados en, 225-227,226f, 227f
enolasa, 222-223, 222f
hexoquinasa, 221-222, 221f
inhibidores de proteasas basados en, 217, 220, 220f, 221f
lisozima, 223-225, 223f, 224f
quimotripsina, 216-220, 216f, 217f, 218f-219f
representación de, 218f
nomenclatura de, 191, 191t, 629r
pH óptimo de, **67**, 67f
receptor. *Véase* enzimas receptores
regulación de, 575-578, 576f, 576t, 577f, 578f, 578t
reguladores. *Véase* enzimas reguladores
RNA. *Véase* ribozimas visión general de, 189-190
EPA. Véase ácido icosapentaenoico
epímeros, **245**, 246f
epítopo de identificación, **336**
par la inmunoprecipitación, 338-339, 339f
epítopo, **176**
ϵ. Véase coeficiente de elasticidad
equilibrio, **25**
definición termodinámica de, 194, 194t
efectos enzimáticos sobre, efectos sobre la velocidad de reacción en comparación con, 192-194, 192f, 193f
regulación metabólica y, 578-580, 579f, 579t
equivalente de reducción, **519**, **710**
ER. *Véase* enoil-CoA reductasa
ErbB, 481, 481f, 482r-483r
Erbitux. *Véase* cetuximab
ergosterol, 371
síntesis de, 833, 835f
eritrocitos, 76f, **921**, 921f
acuaporinas en, **423**
BPG en, 171
carbónico anhidrasa en, 170
en la anemia falciforme, 172-174, 172f
eritromicina, 379f
eritrosa 4-fosfato
biosíntesis de aminoácidos a partir de, 871-873, 870f, 871f, 872f, 873f
en el ciclo de Calvin, 780, 781f, 782f
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 565f, 567f
eritrosa, 246f
eritrulosa, 246s
ERK, en señalización por INSR, 462-463, 462f
erlotinib (Tarceva), 483r
escala de pH, **60**, 60f, 60t, 61
Escherichia coli
acciones reguladoras de sRNA en, 1136-1138, 1136f, 1137f
clonaje de DNA en, 320
complejo PDH de, 619, 620f
componentes moleculares de, 15, 15t
composición en ácidos grasos de, 398t
coordinación de proteína r y síntesis de rRNA en, 1135-1136, 1135f, 1136f
cromosoma de, 952-953, 954f, 954t, 975, 974f
destino de proteínas en, 1109-1111, 1110f
DNA de, 30, 30f
estructura de, 6-7, 6f
expansión del código genético en, 1090r-1092r
expresión de proteínas recombinantes en, 328-329, 329f
genes de, 39
glutamina sintetasa de, 861, 861f
mapa genético de, 979, 980f
metabolismo de la lactosa en, regulación de, 1123f, 1124-1125, 124f, 1130-1131, 1131f
metaboloma de, 577, 577f
plegamiento de proteínas en, 146-147, 148f
poliP y PPK en, 516
procesamiento de rRNA en, 1048, 1048f
promotores de, 1030-1031, 1033f, 1034t, 1120-1121, 1120f
proteína portadora de acilo en, 808
regulación del triptófano en, 1132-1134, 1132f, 1133f
replicación del DNA en, 985-994, 986f-994f
respuesta SOS en, 1134, 1134f
ribonucleósido reductasa de, 888-890, 888f, 890f
ribosomas de, 1081-1082, 1082t
RNA polimerasa de, 1028, 1028f
secuencias terminales en, 1033-1034, 1033f
señalización en, **474**, 476f
síntesis de fosfolípidos en, 825, 826f
síntesis de proteínas en, 1081t
topoisomerasas de, 961, 962f
transcripción en, 1028-1029, 1028f
transportador de lactosa de, **419**, 420, 421f
vectores de expresión, **328**, 328f
vectores plasmídicos, 324-325, 324f, 325f
escisión proteolítica, **228**
de precursores de enzimas reguladores, 232-233, 234f
en la coagulación de la sangre, 234-236, 234f, 235f, 236f
escorbuto, 128r-129r
escramblasas, 398, **399**, 399f
escualeno 2,3-epóxido, **833**, 835f
escualeno monooxigenasa, **833**, 835f
escualeno, **832**
condensación de isopreno en la formación de, 832-833, 834f
núcleo esteroide de cuatro anillos a partir de, 833-834, 835f
esfinganina, **826**, 831f
esfingolípidos, **368**
como lípidos de membrana
acumulaciones anormales de, 371r
balsas de, 401-402, 401f, 402f
como derivados de la esfingosina, 368, 369f
como sitios de reconocimiento biológico, 369-370, 370f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
desplazamiento transmembrana de, 399, 399f
como señal intracelular, 373
síntesis de, 828, 831f
esfingomielina, **828**
como señal intracelular, 373
síntesis de, 828, 831f
esfingomielinas, **368**, 369f
esfingomielinasa, defectos en, 371r
esfingosina, esfingolípidos como derivados de, 368, 369f
ESI MS. *Véase* espectrometría de masas por ionización con electrospray
especies amonotélicas, **682**
especies de oxígeno reactivo (ROS), **716**
daño al DNA por, 300
daño mitocondrial causado por, 739, 743-744
generación por la fosforilación oxidativa de, 715, 738, 738f
hipoxia que conduce a respuestas adaptativas a, 737, 738f
especies ureotélicas, **682**
especies uricotélicas, **682**
especificidad, **197**, **437**
de la transducción de señales, 437, 438f
de las interacciones lectina-glúcido, 273, 273f, 274f
de los canales iónicos, 426-427, 427f, 428f
de los enzimas, 194-195, 195t
contribución de la energía de unión a, 197-199, 198f
espectrina, 401
espectro de acción, **755**, 757f
espectrometría de masas (MS), **100**
análisis de glúcidos mediante, 274-276, 276f
análisis de lípidos mediante, 380f, 381-382, 381f
secuenciación de aminoácidos por, 100-102, 104f, 102f
espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI MS), **100**
análisis de glúcidos mediante, 274-276, 276f
espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI MS), **100**, 101f
espectroscopia CD. *Véase* espectroscopia de dicroísmo circular,
espectroscopia de dicroísmo circular (CD), **125**, 125f
espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR),
análisis de glúcidos mediante, 274-276
determinación de la estructura proteica mediante, 135r-136r
espectroscopia NMR. *Véase* espectroscopia de resonancia magnética nuclear
espermidina, **880**, 880f
espermina, **880**, 881f
espliceosoma, **1042**
mecanismo de, 1043, 1044f
espolones óseos, 266r
esprint, fermentación a ácido láctico durante, 554r
esquema Z, **763**
estabilidad, **116**
de la hélice α, 122-123, 122f, 122t
de proteínas, 116-118
acoplamiento de oxidación y fosforilación en, 724-727, 726f, 727f
catálisis rotacional en, 729-731, 731f, 732f
conformación de la unidad β de la ATP sintasa en, 729, 730f
dominios de ATP sintasa F_o i F_1 en, 727-728, 728f
estabilización del ATP en, 728, 728f
estequiometrías no integrales de consumo de O_2 y síntesis de ATP en, 734-736
flujo de protones que produce moción rotacional en, 731-733, 732f, 733r, 733f
gradiente de protones que impulsa la liberación de ATP en, 728, 729f
sistemas lanzadera de NADH para, 735, 736f
hidrólisis de
energía libre de hidrólisis de, 507-509, 508f, 508t
inhibición inducida por hipoxia de, 737, 738f
regulación de la biosíntesis de pirimidinas por, 887, 887f
regulación de la piruvato quinasa por, 593-594, 593f
regulación de PFK-1 y FBPasa-1 en, 590-591, 590f
regulación del complejo PDH por, 637-638, 638f
rendimiento en la oxidación de glucosa, 633, 633t, 737, 737t
síntesis de
en bacterias halófilas, 773, 774f
por fotofosforilación, 769-771, 770f, 771f
síntesis de histidina a partir de, 872-873, 874f
transferencias de grupos fosforilo y
en el transporte activo y en la contracción muscular, 510-511, 514
en el ensamblaje de macromoléculas informativas, 514
energía proporcionada por, 510-513, 512f
cambio de energía libre para la hidrólisis de ATP, 507-509, 508f, 508t
polifosfato inorgánico como dador de grupo fosforilo, 516
compuestos fosforilados y tioésteres con grandes cambios de energía libre de hidrólisis, 509-510, 510f, 511f, 511t
reacciones que intervienen en, 513-514, 513f, 515r
en transfosforilaciones entre nucleótidos, 514-515, 516f
uso de en el ciclo de la urea, 686
utilización muscular de, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
estado basal, **192**, **755**
de reacciones químicas, 192, 192f
estado bien nutrido,
metabolismo energético en, 923o, 924f, 923t
metabolismo glucídico global durante, 609-611, 610f, 611f
estado de ayuno
combustible para el cerebro durante, 927-929, 927t, 928f, 929f
metabolismo energético en, 925-929, 926t, 927f
metabolismo glucídico global durante, 609-611, 610f, 611f
estado de transición, 27f, **28**, 192f, **193**
en reacciones enzimáticas, 193, 193f
optimización de interacciones débiles en, 193f, 196-197, 196f, 197f
estado de transición, **767**
estado estacionario dinámico
de organismos vivos, 21, 575
mantenimiento de, 575
estado estacionario, **202**
de organismo vivos, 21, 575
mantenimiento de, 575
estado excitado, **755**
estado L_α. *Véase* estado líquido desordenado
estado líquido desordenado (L_α), **397**
de las bicapas lipídicas, 397-398, 398f
estado líquido ordenado (L_β), **397**
de las bicapas lipídicas, 397-398, 398f
estado pre-estacionario, **202**
estado R, **164**, 165f, 166, 166f
efectos de BPG sobre, 171-172, 171f, 172f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
estado T, **164**, 165f, 166, 166f
efectos del BPG sobre, 171-172, 171f, 172f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
estatinas, **843**, 845r-846r
estearato, síntesis de, 814, 814f

Corrección

estearil-ACP desaturasa (SCD), **815**, 815f, 816r
estercobilina, 876, 877f
estereoespecificidad, **16**
de las interacciones entre biomoléculas, 19-20, 19f, 20f
estereoisómeros L de aminoácidos, 78
estereoisómeros, **16**, 17-19, 17f, 18f, 18r
aminoácidos como, 76, 78, 78f
azúcares como, 244-245, 245f, 246f
ésteres de colesterol, **836**, 835f
endocitosis de, 838-839, 840f
esteroles, **870**. *Véase* también colesterol
como lípidos de membrana, anillos carbonados fusionados de, 370-372, 370f
desplazamiento transbicapa de, 399 fluidez de la bicapa lipídica y, 398
esteviósido, 265r
estigmasterol, 371
síntesis de, 833, 835f
estradiol, como derivado del colesterol, 365f
estreptomicina, **1104**, 1145
estrés
coordinación metabólica por AMPK durante, 935-936, 935f, 936f, 937f
señalización por cortisol de, 930
estrés oxidativo,
daño del DNA por, 300
daño mitocondrial causado por, 739, 743-746
en la deficiencia de G6PD, 566r
generación por fosforilación oxidativa de, 715, 722-723, 723f
hipoxia que conduce a, respuestas adaptativas para, 737-739, 738f
estrógeno, **844**, 905
síntesis de, 844-845, 844f
estroma, **753**
estructura cuaternaria, **96**, **125**
de la hemoglobina, 163-164, 164f
de proteínas, 96, 96f
gama de, 141-142, 142f
estructura de, efectos de unión de, 162-163, 162f
estructura primaria, 96
de proteínas, 96, 96f
espectrometría de masas para la secuenciación de aminoácidos, 100-102, 101f, 102f
información bioquímica a partir de las secuencias de aminoácidos, 104, 105r
información histórica a partir de las secuencias de aminoácidos, 103-107, 106f, 107f, 108f
métodos clásicos de secuenciación de aminoácidos, 97-99, 98f, 99f, 100f, 100t
papel de la secuencia de aminoácidos en la función de proteínas, 96-97
proteínas con secuencias de aminoácidos determinadas, 97, 97f
síntesis química de proteínas, 102, 103f, 104t
estructura secundaria, **96**, **120**
de proteínas, 06, 96f, 116
ángulos diedros de, 124-125, 124f
conformación β, 121t, 123, 123f
espectroscopia CD de, 125, 125f
giros β, 121t, 123, 124f
hélice α, 120-123, 120f, 121r, 121t, 122f, 122t
integrales de membrana, 394
estructura supersecundaria, **137**
de proteínas globulares, 133, 133t, 137-138, 137f, 138f
estructura terciaria, **96**, **125**
de proteínas, 96, 96f
clasificación basada en, 140-141, 140f
fibrosas, 126-131, 126f, 126t, 127f, 127t, 128r-129r, 130f, 131f
globulares, 131-138, 131f, 132f, 132r, 133f, 133t, 134r-136r, 137f, 138f
intrínsecamente desordenadas, 138-140, 139f
secuencia de aminoácidos y, 144, 144f
estructura tri-dimensional,
de ácidos nucleicos,
doble hélice del DNA, 287-289, 288f, 289f, 290f
efectos de las bases de los nucleótidos sobre, 286, 286f, 287f
estructuras inusuales adoptadas por secuencias de DNA, 290f, 291-293, 291f, 292f
mRNA, 293, 293f, 294f
rRNA, 293-295, 293f, 294f, 296f, 1081-1083, 1082t, 1083f
RNA, 293-295, 293f, 294f, 296f, 1084, 1084f, 1086f
variación del DNA en, 289f, 290-291, 290f
de biomoléculas, 16-19, 16f, 17f, 18f, 19f
de proteínas integrales de membrana, 394
de proteínas, 31-32, 32f, 115, 115f
determinación de, 134r-135r
estructuras supramoleculares,
de las células, 9-10, 10f, 11f
ribosomas como, 1081-1083, 1082t, 1083f
estudios in vitro, de células, 10-11, 11f
etanol
extracción de lípidos mediante, 380
metabolismo por el enzima P-450 de, 817r
para el envenenamiento por metanol, 210
transferencia de electrones por, 719, 719f
éter etílico, extracción de lípidos mediante, 380
ETF: ubiquitina oxidorreductasa, **719**
a partir de biomasa, 257, 788r-789r
ETF. *Véase* flavoproteína transferidora de electrones
etiqueta de glutatión-*S*-transferasa (GST), 331, 332f
etiqueta GST. *Véase* etiqueta glutatión-S-transferasa
etiquetas de purificación por afinidad en tándem (TAP), 338, 338f, 339f
etiquetas TAP. *Véase* etiquetas de purificación por afinidad en tándem
etiquetas terminales, para la purificación de proteínas, 331-333, 332t, 332f
etiquetas, **331**
epítopo, 336
para inmunoprecipitación, 338-339, 338f, 339f
teminal, 331-332, 332f
Etopophos. *Véase* etopósido
etopósido (Etopophos), 965r
Eucaria, 4f, **5**
eucariotas, **3**
células de, 7-8, 8f, 9f
cromosomas de, 953-955, 954t, 955f
complejidad de, 955-957, 956f, 957t
destino de proteínas en, 1105-1106, 1106f, 1107f
evolución de, 37, 37f, 38f, 742-743, 743f
inicio en, 1093-1095, 1094f, 1096t
interacciones proteína-proteína en proteínas reguladoras de, 1128-1130
meiosis en, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1015f
procesado del RNA ribosómico en, 1047-1049, 1049f, 1050f
recombinación del DNA en, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1015f
regulación génica en, 1120-1121
activadores de unión al DNA y coactivadores en el ensamblaje del factor de transcripción basal, 1142-1145, 1143f, 1145f
control del desarrollo vía cascadas proteicas reguladoras, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
estructura de la cromatina transcripcionalmente activa, 1140-1141, 1141t
estructura modular de los activadores de la transcripción, 1145-1146
formas de regulación mediadas por RNA, 1151
fosforilación de los factores de la transcripción nuclear, 1148-1149
potencial de desarrollo de células madre, 1157-1160, 1157f, 1160f
regulación positiva de promotores, 1141-1142, 1142f
regulación positiva y negativa de los genes del metabolismo de la galactosa en la levadura, 1145-1146, 1146f, 1147t
represión traduccional de los mRNA, 1149-1150, 1150f
señales intercelulares e intracelulares, 1146-1148, 1148f, 1149f, 1149t
silenciado postranscripción por interferencia del RNA, 1150-1151, 1151f
replicación del DNA en, 994-996, 995f
ribosomas de, 1081-1083, 1083f
transcripción en
casquete 5' de los RNA mensajeros, 1040-1041, 1040f
extremo 3' de los RNA mensajeros, 1045, 1045f, 1046f
RNA polimerasa en, 1034, 1035f
transposición en, 1019
transposones de, 1019
eucarióticos, 1093-1095, 1094f, 1095f, 1096t
eucromatina, **970r**, **1140**
evolución
conexión entre desarrollo y, 1158r-1159r
de biomoléculas, 33-34, 34f
de cloroplastos, 37, 38f, 772-773, 772f, 773f
de GPCR, 458-460, 459t, 459f
de la fotosíntesis, 36, 771-773, 772f, 773f, 774f
de la regulación metabólica, 575, 580-581
de las células eucarióticas, 36-37, 37f, 38f
de las mitocondrias, 37, 38f, 742-743, 743f
de las primeras células, 35-36, 36f
de los organismos vivos, **2**, 2f
de los organismos vivos, información de la secuencia de aminoácidos sobre, 104-106, 106f, 107f, 108f
de RTK, 464
de rubisco, 787
de timina en el DNA, 299
de transposones, retrovirus e intrones, 1057-1058, 1058f, 1060f
del ciclo del ácido cítrico, 634
del genoma humano
comparaciones con las especies biológicas más próximas, 345-347, 348f, 349f, 350f
historia de, 351-353, 352f, 353r-354r
del sistema leptina, 934
divergente, **628**
de los enzimas de la oxidación de ácidos grasos, 663-664, 664f
el mundo RNA en la, 34-35, 35f
ribointerruptores como vestigio de, 1137
síntesis dependiente de RNA como clave de, 1062-1065, 1062f, 1063r, 1064f
fotosíntesis en, 771-773, 772f, 773f
línea del tiempo en, 35
motivos estructurales proteicos y, 14
papel de la regulación génica en, 1160, 1158r-1159r
proceso de, 32-33, 33f
relaciones basadas en, 37-39, 38t
evolución divergente, **628**
de los enzimas de la oxidación de los ácidos grasos, 663-664, 664f
evolución química, 33-34, 34f
evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial, **1063r**, **1064**
excinucleasa ABC, 1001
excinucleasas, 1001
excitán, **755**
excreción de nitrógeno vía ciclo de la urea, 681-682
defectos en, 686-687, 686t, 687f
interconexiones de rutas que reducen el coste energético de, 686
pasos enzimáticos de, 682, 683f, 684f
reacciones que proporcionan grupos amino a, 683f
regulación de, 684-685, 685f
uniones del ciclo del ácido cítrico a, 682-684, 683f, 686r
excreción de nitrógeno, ciclo de la urea, 681-682
ciclo del ácido cítrico se une con, 682-684, 685f, 685r
defectos en, 686-687, 687f, 686t
interconexiones de la ruta que reducen el coste energético de, 686
pasos enzimáticos de, 682, 683f, 684f
reacciones que aportan grupos amino al, 663f
regulación de, 684-685, 685f
exenatide (Byetta), 943t
exocitosis, **8**
exoglucosidasas, análisis de glúcidos mediante, 274
exoma, **344r**
exones, **345**, **956**, 956f
en el genoma humano, 345-346, 346f
en el procesado del RNA, 1039
transcripción de, 1041
exonucleasas, **983**
en reparación de apareamiento incorrecto, 1000, 1000f
exorribonucleasa, 1053
exosoma, **1054**
experimento de Meselson-Stahl, 981-982, 981f
exportina-5, 1051f
expresión de genes constitutivos, **1120**
expresión génica regulada, **1120**
expresión génica,
constitutivos, 1120
desencadenamiento por leptina de, 933-934, 934f
en la regulación metabólica, 575-577, 576f
genes clonados
sistemas bacterianos utilizados para, 327-329, 329f
sistemas celulares de mamífero utilizados para, 329
sistemas de insectos y virus de insectos utilizados para, 329-330, 330f

COPY STATION

sistemas de levadura utilizados para, 329
vectores de, 327-328, 328f
microchips de DNA que muestran, 340-341, 340f, 341f
regulación de la glucólisis y gluconeogénesis por, 594-598, 595t, 594f, 596f, 597r
regulación de. *Véase* regulación génica
regulación del colesterol por, 841-843, 841f, 842f
regulación por la dieta de, 937-938, 938f
regulación por la insulina de, 462-463, 462f
regulada, 1120
RNA polimerasa II en, 1034
expresión. *Véase* expresión génica
extracción, lípidos, 380, 380f
extracto crudo, **69**
extremo 3', **285**, 285f
de los RNA mensajeros, 1045, 1045f, 1046f
extremo 5', **285**, 285f
extremo del cebador, **984**
extremo reductor, **252**
extremos cohesivos, **322**, 323f
extremos romos, 322, 323f
ezetimibe, 844

F

F-actina, 181, 180f
F_1 ATPasa, **726**
F26BP. *Véase* fructosa 2,6-bisfosfato
factor activador 1 de la proteasa de la apoptosis (Apaf-1) **741**, 742f
factor activador plaquetario, **367**, 367f, **827**
síntesis de, 827-828, 830f
factor antisilenciador 1, 969
factor de crecimiento fibroblástico (FGF), unión del heparán sulfato por, 265
factor de ensamblaje de la cromatina 1 (CAF1), 969
factor de necrosis tumoral (TNF), en apoptosis, 485, 496f
factor de replicación C (RFC), 996
factor de respuesta severa, **1135**, 1136f
factor de transcripción inducible por la hipoxia (HIF-1), **546r**, 639f, 640, 738
factor intrínseco, **661r**
factor IX, **235**, 235f
factor IXa, **235**, 235f
factor natriurético auricular (ANF), **466**
factor tisular (TF), **235**, 235f
factor VII, **235**, 235f
factor VIIa, **235**, 235f
factor VIII, deficiencia de, 236, 236f
factor VIIIa, **235**, 236f
factor X, **235**, 235f
factor Xa, **235**, 235f
factor XI, **235**, 235f
factor XIIIa, **235**, 235f
factores de crecimiento, **478**
acciones de la insulina como, 462-463, 462f
regulación del ciclo celular por, 478, 479f
factores de elongación, **1095**, 1095f, 1096-1097, 1098f
factores de especificidad, **1121**
factores de inicio (IF),
bacterianos, 1089-1093, 1093f, 1096t
factores de intercambio de histonas, **969**
factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF), **443r**
factores de liberación, **1098**, 1099, 1099f
factores de terminación, **1098**, 1099, 1099f
factores de transcripción basal, 1036, 1142
activadores y coactivadores de la unión de DNA en el ensamblaje de, 1142-1145, 1143f, 1145f
factores de transcripción general, **1036**
activadores y coactivadores de unión al DNA en el ensamblaje de, 1142-1145, 1143f, 1145f
factores de transcripción nuclear, fosforilación de, 1148-1149
factores de transcripción, **575**, **1036**
activadores de unión al DNA y coactivadores en el ensamblaje de, 1142-1144, 1143f, 1145f
en la regulación de la glucólisis y gluconeogénesis, 594-598, 594f, 595t, 596f, 597r
en la regulación metabólica, 575-576, 576f
en la transcripción por RNA polimerasa II, 1037f, 1038
fosforilación de, 1149
factores proteicos, para la RNA polimerasa II, 1034-1038, 1036t, 1037f
FAD. *Véase* flavina adenina dinucleótido
fagocitosis, de anticuerpos unidos, 177, 176f
familia CHD, **1140**
familia de, 159
familia del citocromo P450, **740**, **816r**
monooxigenasas, 816r-817r
síntesis de esteroides por, 740, 741f, 817r
oxigenasas del retículo endoplasmático, 740
familia Hsp60, 146-147, 148f
familia Hsp70, **146**, **147f**
familia INO80, **1140**
familia ISWI, **1140**
familia *Shaker*, canales de K^+ accionados por voltaje, 426-427, 428f
familia SWI/SNF, **1140**
familias proteicas, **141**
familias, proteínas, 141
fármacos opiáceos, acciones señalizadoras de la proteína G de, 448
fármacos, metabolismo por el enzima P-450 de, 741, 816r-817r
farnesil pirofosfato, **832**
en la síntesis del colesterol, 832, 834f
farnesilación, postraducción, 1102, 1102f
FAS. Véase ácido graso sintasa
fase de beneficios, de la glucólisis, 535f, 536, 540
conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato, 536f, 543-544, 543f
deshidratación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, 536f, 544
oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, 536f, 540-541, 542f
transferencia de fosforilo del 1,3-bisfosfoglicerato a ADP, 536f, 541-543
transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP, 536f, 544
fase G0, 476, 476f
fase G1, 476, 476f
fase G2, 476, 476f
fase M, 476, 476f
fase preparatoria, de la glucólisis, 534-536, 535f
conversión de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato, 536f, 538, 539f
fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato, 536f, 539-540
fosforilación de glucosa, 536f, 538
interconversión de triosas fosfato, 536f, 540, 542f
rotura de fructosa 1,6-bisfosfato, 536f, 540, 541f
fase S, 476, 476f
favismo, 566f
FBPasa-1. *Véase* fructosa 1,6-bisfosfatasa
FBPasa-2. *Véase* fructosa 2,6-bisfosfatasa
FCCP. *Véase* carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenil-hidrazona
FdG. *Véase* 2-fluoro-2-desoxiglucosa
fem. *Véase* fuerza electromotriz
fenilalanina amoníaco liasa, 697
fenilalanina hidroxilasa, **695**, 696, 696f, 697f, **871**
fenilalanina, **79**, 79s, 80, 80f, 80r, **694**, **871**
biosíntesis de, 871, 873f
catabolismo de, 688f, 689, 694, 695f, 696f
defectos en, 694t, 694-696, 696f, 697f
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
sustancias vegetales derivadas de, 880, 880f
fenilbutirato, para defectos del ciclo de la urea, 686, 687f
fenilcetonuria (PKU), 694t, **695**, 696-698, 696f, 697f
fenilpirúvato, **696**, 697f
fenofibrato (TriCor), 937
fenotipo, **951**
feocromocitoma, 916
feofitina, **758**
fermentación alcohólica. *Véase* fermentación etanólica
fermentación del ácido láctico, **537**, 537f
piruvato como aceptor electrónico terminal en,
fermentación etanólica, 537, 537f, 553, 553f, 554r
fermentación, **534**, **553**
del piruvato
alimentos y productos químicos industriales producidos por, 555-557
etanol, 537, 537f, 553, 553f, 556r
tiamina pirofosfato en, 555, 555f, 558t
piruvato, 536
fermentación ácidoláctica, 537, 537f, 552-553, 554r
ferredoxina-tiorredoxina reductasa, **785**, 785f
ferredoxina, **761**, 765, **858**
flujo electrónico cíclico con, 765
ferredoxina:NAD reductasa, **761**
ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa, **765**
ferritina, **626r**, 627r
ferroquelatasa, 876
FFA. *Véase* ácidos grasos libres
FGF. *Véase* factor de crecimiento fibroblástico
FGFR. *Véase* receptor del factor de crecimiento fibroblástico
FH. *Véase* hipercolesterolemia familiar
fibra de 30 nm, **976**, 972f
fibras musculares, **182**, 181f
fibratos, 937
fibrina, **234**
en la coagulación de la sangre, 234-235, 234f, 235f
fibrinógeno, **234**
en la coagulación de la sangre, 234-235, 234f, 235f
fibroína de la seda, estructura y función de, 131, 131f
fibroína, estructura y función de, 131, 131f
fibronectina, 267
fibrosis quística (CF)
canal iónico defectuoso en, 419r-420r, 430-431, 430t
plegamiento incorrecto de proteínas en, 150-151
fibrosis quística (CFTR), 417-418, 419r-420r
ficobilinas, **755**
absorción de la luz por, 755, 757f
estructura de, 756f
ficobiliproteínas, **755**
ficobilisomas, 755
fidelidad, en la síntesis de proteínas, 1099
fijación de carbono, **775**
fijación de dióxido de carbono (CO_2), **775**
en 3-fosfoglicerato, 777-778, 776f, 778f, 779f
fijación de membranas (patch-clamping), **426**
de canales iónicos, 426, 425f
fijación de nitrógeno, 854-860, 854f, 858f, 859f, 860f
fijación
heterotrópica, 166
homotrópica, 166
proteína-ligando. *Véase* interacciones proteína-ligando
respuesta de los enzimas alostéricos a la, 228-229, 228f, 229f
fijación, **854**
nitrógeno, 854-860, 854f, 858f, 859f, 866f
filamentos delgados, 180f, **181**
interacciones del filamento grueso de miosina con, 182f, 183f, 183
organización de, 181f, 182-183
filamentos gruesos, 180f, **181**
interacciones del filamento delgado de actina con, 182f, 183, 183f
organización de, 181f, 182-183
filamentos intermedios, 7, 9f
filoquinona (QK), **765**
filtración sobre gel. *Véase* cromatografía de exclusión por tamaño
Fire, Andrew, 1160
Fischer, Emil, 78, 196
flagelos,
movimiento de, 179
rotación de, 743, 743f
flavina adenina dinucleótido (FAD), 312f, 524-525, 525f
en la cadena respiratoria mitocondrial, 708-710
en el complejo PDH, 619
flavina mononucleótido (FMN), 524-525, 525f
en la cadena respiratoria mitocondrial, 708-710, 712f
flavoproteína transferidora de electrones (ETF), **654**
transferencia electrónica por, 719, 719f
flavoproteínas, **524**, 525, 525f, **712**
en la cadena respiratoria mitocondrial, 710
Fleming, Alexander, 225
flipasas, **399**, 399f
flopasas, **399**, 399f
flujo (*J*), **575**, **583**
contribución de los enzimas al
capacidad de respuesta al cambio y, 583-585, 584f, 584r-585r
efectos controladores externos y, 583-585, 585r
efectos de la actividad sobre, 583, 583f, 584r-585r
medida experimental de, 582-583, 583f
mecanismo para incrementar, 580
flujo de carbono, antropogénico, 788r
flujo electrónico
a través del complejo del citocromo b_6f, 765-766, 766f
cíclico, 765-766
en clorofilas, 756, 759f
termodinámica de, 761-762
en el centro de reacción Fe-S, 762

CORESTATION

en el centro de reacción feofitina-quinona, 759-760, 761f
en el fotosistema I, 764f, 765
en el fotosistema II, 763-765, 764f
en la fotosíntesis, 752-755, 753f, 764f, 755f
gradiente protónico y, 770, 770f
no cíclico, 765
flujo electrónico cíclico, **765**
flujo electrónico no cíclico, **765**
fluorescencia, **755**
fluoróforos, 336, 337f
fluoroquinolonas, 956r
fluorouracilo, **894**, 894f
fMet. *Véase N*-formilmetionina
FMN. *Véase* flavina mononucleótido
folato, 689
deficiencia de, 689-691, 891
fondos (pools) metabólicos, 799, 798f, **799**
forkhead box other (FOXO1), **596**, 596f
forma A del DNA, **290**, 290f, 291
forma A del RNA, 293, 294f
forma B del DNA, **290**, 291, 290f
forma Z del DNA, 290, 290f, 291
formas replicativas, **952**
fórmulas de perspectiva de Haworth, **247**, 247f
conversión de las fórmulas de proyección de Fischer en, 246-248
fórmulas de proyección de Fischer, **244**
conversiones de las fórmulas de perspectiva de Haworth a, 247
de monosacáridos, 244-245, 245f
Fos, en regulación del ciclo celular, 478, 479f
fosfágenos, **516**
fosfatasas, **629r**
fosfatidilcolina, 366f, **827**
desplazamiento transbicapa de, 399, 399f
síntesis de, 827-828, 828f, 829f
fosfatidiletanolamina, 366f, **825**
desplazamiento transbicapa, 399
síntesis de, 826f, 827-828, 828f, 829f
fosfatidilglicerol, 366f, **825**
síntesis de, 825,826f, 827, 827f
fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3),
en membranas, unión de proteínas a, 397
en señalización INSR, 463-464, 463f, 464f
papel señalizador de, 373
fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), 366f
como señal intracelular, 370f, 372
en membranas, unión de proteínas a, 396
fosfatidilinositol quinasas, **827**, 827f
fosfatidilinositol, síntesis de, 827, 827f
fosfatidilinositoles, como señales intracelulares, 372-373
fosfatidilserina, 366f, **825**
movimiento transbicapa de, 399
síntesis de, 825, 826f, 827-828, 828f, 829f
fosfato translocasa, 734f, **734**
fosfato, sistema de cotransporte antiparalelo (antiport) P_i-triosa fosfato, 781-783, 784f
fosfocreatina (PCr), **676**
biosíntesis de, 878, 879f
en músculo, 916-917, 918f, 918r-919r
energía libre de hidrólisis de, 509, 509f, 510f, 511t
fosfodiesterasa (PDE), 466
en señalización de la visión, 456-458, 456f, 457f, 458r
fosfoenolpiruvato (PEP), **544**
biosíntesis de aminoácidos a partir de, 870, 870f, 871f, 872f, 873f
conversión del piruvato en, 558-561, 560f, 561f
regulación de, 593-594, 593f
en el ciclo del glioxilato, 795f, 796
en glucólisis, 535f, 536f, 538, 543-545
en gluconeogénesis, 558-561, 560f, 561f
energía libre de hidrólisis de, 509-510, 509f, 510f, 511t
fosfoenolpiruvato carboxilasa, **790**
en la ruta C_4, 790, 791f
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, **560**
en la gliceroneogénesis, 823, 823f, 824f
en la gluconeogénesis, 560-561, 560f
oxalacetato producido por, 634, 635f, 635t
regulación de la transcripción de, 597, 586f
fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), **539**
en la ruta glucolítica, 536f, 539-540
en regulación metabólica y control, 578, 582-583, 583f, 586
regulación de,
por fructosa 2,6-bisfosfato, 591, 591f, 592f
recíproca, 590-591, 590f
fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), **592**, 592f
fosfoglicerato mutasa, **543**
en la ruta glucolítica, 536f, 544, 543f
fosfoglicerato quinasa, **541**
en la ruta glucolítica, 536f, 541-544
fosfoglicéridos. *Véase* glicerofosfolípidos
fosfoglicolohidroxamato, 216f
fosfoglucomutasa, **550**, **599**, 599-600, 601f, 601
fosfoglucosa isomerasa, **538**
en la ruta glucolítica, 536f, 539, 539f
fosfohexosa isomerasa, **538**
en la ruta glucolítica, 536f, 539, 539f
fosfoinositido 3-quinasa (PI3K), 463-464, 463f
fosfolipasa C (PLC), **450**
análisis de membranas mediante, 391, 392f
en señalización pGPCR, 450-451, 454f
fosfolipasas, 370, 370f
fosfolípidos, 364f-365f, **365**
bicapa de la membrana con, 389-391, 389f, 390f, 391f
de proteínas de membrana, 394, 394f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
desplazamiento transbicapa de, 399, 399f
esfingolípidos. *Véase* esfingolípidos
glicerofosfolípidos. *Véase* glicerofosfolípidos
síntesis de,
CDP-diacilglicerol en, 825-827, 826f, 827f
esfingolípidos, 828, 831f
plasmalógeno, 827-828, 830f
precursores de, 820-821, 821f
rutas eucarióticas a la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, 827, 828f, 829f
transporte a membranas celulares después de, 828-829
unión de los grupos de cabeza de fosfolípidos, 824-825, 825f
fosfomanosa isomerasa, **552**
fosfopentosa isomerasa, **565**
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 564f
fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1)
como regulador central en el metabolismo del glucógeno, 609, 610f
regulación de la glucógeno fosforilasa por, 231-232, 231f, 237f
regulación de la glucógeno sintasa por, 608, 608f
fosfoproteína fosfatasa 2a (PP2A), 592-593, 593f
fosfoproteína fosfatasas, **231**, 232
en la terminación de la señalización β-adrenérgica, 448
fosforilación a nivel de sustrato, **543**
fosforilación ligada a la respiración, **543**
fosforilación oxidativa,
agentes que interfieren con, 715t
cadena respiratoria mitocondrial,
anatomía de la mitocondria y, 708, 709f
Complejo I, 713-715, 713t, 714f, 715t
Complejo II, 713t, 714f, 715-716, 716f
Complejo III, 713t, 714f, 716-171, 716f, 716f, 717f
Complejo IV, 713t, 714f, 717-718, 718f, 738f, 739
convergencia de electrones a aceptores electrónicos universales, 708-710, 710t
desacoplamiento de, 715t, 727, 727
donación de electrones vía ubiquinona, 719-720, 719f
generación de ROS por, genes que codifican proteínas de, 741-742, 742t, 743f
gradiente de protones en, 720-722, 722f
oxidación del NADH en mitocondrias de plantas, 723, 724r-725r
paso de electrones a través de transportadores ligados a la membrana, 710-713, 711f, 712f, 712t, 713f
respirasomas en, 719, 719f, 720r-721r
mecanismo de, 707-708, 707f
regulación de, 715, 722-723, 723f
inhibición inducida por la hipoxia de la hidrólisis de ATP, 737, 738f
por necesidades energéticas de las células, 737
regulación coordinada de las rutas productoras de ATP, 739, 739f
respuestas adaptativas que disminuyen la producción de ROS en la hipoxia, 737-739, 738f
rendimiento de ATP en, 736-737, 737f
síntesis de ATP en, 707-708, 707f, 724
acoplamiento de oxidación y fosforilación en, 724-727, 726f, 727f
catálisis rotacional en, 729-731, 731f, 732f
conformaciones de la unidad β de la ATP sintasa en, 729, 730f
dominios F_o y F_1 de la ATP sintasa en, 727-728, 728f
estabilización del ATP en, 728, 728f
estequiometrías no integrales del consumo de O_2 y síntesis de ATP en, 733-734
flujo de protones que produce moción rotacional en, 731-733, 732f, 733r, 733f
gradiente de protones que impulsa la liberación de ATP en, 728, 729f
sistemas de lanzadera del NADH ara, 735, 736f
transporte activo impulsado por la fuerza protón motriz en, 734-735, 734f
fosforilación, 629r. *Véase también* fotofosforilación
a nivel de sustrato, 543
de ATPasas tipo P, 413-416, 414f, 416f
de enzimas reguladores, 230-232, 231f, 232f, 237f
múltiple, 232, 233f, 233t
de factores de transcripción nucleares, 1148-1149
de fructosa 6-fosfato, como tercer paso de la ruta glucolítica, 539-540
de glucógeno sintasa, 607-608, 608f
de glucosa, como primer paso de la ruta glucolítica, 538-539
de HMG-CoA reductasa, 841, 841f, 842f
de la acetil-CoA carboxilasa 812, 813f
de monosacáridos, 248-250
del complejo PDH, 637-638, 638f
desacoplamiento de, 715f
desensibilización del receptor β-adrenérgico por, **448-449**, **448f**, **449f**
en cianobacterias, 772-773, 772f, 773f
en la regulación metabólica, 578, 578f
en la replicación de DNA, 983-984, 984f
en la señalización en bacterias, 474, 475f
en la síntesis de sacarosa, 794, 794f
flujo electrónico y, 770, 770f
inicio por RTK de, 460-463, 461f, 462f
ligada a la respiración, 543
oxidación acoplada a. *Véase* fosforilación oxidativa
por CDK, 479-480, 479f
por la PKA,
en la señalización β-adrenérgica, 441-444, 445f, 446f, 445-446, 447f, 447t
en otras señalizaciones npor GPCR, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
por PKC, 450-451, 454f
por PKG, 465-466, 465f
postraducción, 1100-1103, 1102f
regulación de la CDK por, 476-477, 477f, 478f
síntesis de nucleósidos trifosfato vía, 887
fosforilasa *b* quinasa, 452-453, **604**
activación de la glucógeno fosforilasa por, 604, 605f, 606f
fosforilasa quinasa, regulación de la glucógeno fosforilasa por, 232, 232f, 237f
fosforilasas, **629r**
fosforólisis, 629r
del glucógeno y almidón, para la glucólisis, 550, 549f, 550f
fosfoserina, 1102f
fosfotirosina fosfatasas, 467, 468
fosfotirosina, 1102f
fosfotreonina, 1102f
fotofosforilación cíclica, **766**
fotofosforilación, **752**
cíclica, 766-767
en cianobacterias, 773-773, 772f, 773f
estequiometría de, 770-771
síntesis de adenosina trifosfato por, 769-771, 770f, 771f
fotoliasas, **525**
DNA, 998t, 1001-1002, 1003f
fotolitografía, 340-341, 340f
fotón, **754**
absorción de, 755
energía en, 754-755
fotorrespiración, 723, **786**
actividad oxigenasa de la rubisco en, 786-787, 786
en plantas C_4, 788-791, 791f
en plantas CAM, 791-792
fotosíntesis oxigénica, **768**
fotosíntesis, **752**
absorción de la luz, 752, 751f, 762f
por clorofilas, 755, 756f, 757f
por cloroplastos, 752-753, 753f, 754f, 755f
por pigmentos accesorios, 755, 757f
transferencia de excitones de, 756-757, 758f, 759f

Confidential

asimilación de CO_2, 777, 775f
3-fosfato, 778-779, 780f
activación por la luz en, 783-785, 784f, 785f
conversión de 3-fosfoglicerato en gliceraldehído
fases de, 777, 775f
fijación de CO_2, 777-778, 776f, 778f, 779f
necesidades de NADPH y ATP, 779-781, 783f, 784f
regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato, 779, 781f, 782f, 783f
sistema de transporte para, 781-783, 783f, 784f, 785f
centro de reacción fotoquímico. *Véase* centro de reacción fotoquímico,
ciclo en C_2, 788-791
en organismos modificados genéticamente, 788, 788r-789r
en plantas C_4, 788-791, 791f
en plantas CAM, 791-792
evolución de, 36, 771-773, 772f, 773f, 774f
fotorrespiración en. *Véase* fotorrespiración
oxigénica, 762
reacciones oscuras de, 780-781
ruta del glicolato en, 787, 787f, 788, 790f
síntesis de almidón en, 792-794, 796f
síntesis de ATP por fotofosforilación, 769-771, 770f, 771f
síntesis de sacarosa en, 792-793, 793f, 794f
fotosistema I (PSI), **762**. *Véase también* centro de reacción fotoquímico Fe-S,
complejo del citocromo b_6f y, 765, 766f
flujo electrónico cíclico entre, 765-766
en cianobacterias, 772-773
energía de excitación para, 766-766
esquema Z de, 763, 762f
estado de transición y, 766-768, 767f, 768f
estructura de, 765, 764f
LHCII y, 766-768, 767f, 768f
localización en la membrana del tilacoide de, 766-767, 767f
mecanismo de, 765, 764f
fotosistema II (PSII), **762**. *Véase también* centro de reacción feofitina-quinona
complejo de liberación de oxígeno y, 768-769, 769f
complejo del citocromo b_6f y, 765-766, 766f
en cianobacterias, 772-773
energía de excitación para, 767
esquema Z de, 763, 762f
estructura de, 764-765, 764f
LHCII y, 766-768, 767f, 768f
localización en la membrana del tilacoide de, 766-767, 767f
mecanismo de, 763-765, 764f
transición de estado y, 766-768, 767f, 768f
fotosistemas, **756**
fotótrofos, **5**, 5f
FOXO1. *Véase forkhead box other*
fraccionamiento celular, 7, 9f
fraccionamiento, **89**
de proteínas, 89-90, 90f, 91f
fracciones, proteína, 89
fragmento de Klenow, **987**
fragmento Fab, **176**
fragmento Fc, **176**
fragmento grande, de la DNA polimerasa I, **987**
fragmentos de Okazaki,
en la replicación del DNA, 983, 983f
síntesis de, 991-993, 991f
Framingham Heart Study, 845r
Franklin, Rosalind, 288
FRAP. *Véase* recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración
Frenkel, Albert, 770
FRET. *Véase* transferencia de energía de resonancia fluorescente
fructanos, 940
fructoquinasa, **551**
fructosa 1-fosfato aldolasa, **561**
fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa1), **561**
activación por la luz de, 785, 75f
en el ciclo de Calvin, 779, 781f regulación de, por la fructosa 2,6-bisfosfato, 592, 592f
recíproca, 590-591, 590f
fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, **540**
en la ruta glucolítica, 536f, 540, 541f
fructosa 1,6-bisfosfato, **539**
en el ciclo de Calvin, 779, 781f
en la gluconeogénesis, conversión a fructosa 6-fosfato, 561
en la ruta de las pentosas fosfato, 565-567, 565f, 567f
en la ruta glucolítica, 535f, 536, 536f, 539-540, 541f
fructosa 2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2), **592**, 591f, 592f
fructosa 2,6-bisfosfato, **591**, **708**
en la síntesis de sacarosa, 792-794, 794f
regulación de PFK-1 FBPasa-1 por, 591, 591f
xilulosa 5-fosfato y, 592, 593f
fructosa 6-fosfato, **538**
en el ciclo de Calvin, 779, 781f
en la gluconeogénesis, conversión de fructosa 1,6-bisfosfato en, 561
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 565f, 567f, 568f
en la ruta glucolítica, 535f, 536, 536f, 539-540, 541f
en la síntesis de sacarosa, 792-793, 793f, 795f, 796
fructosa, 243-244, 245s, 246s
en rutas alimentadoras de la glucólisis, 594f, 551-552
formas cíclicas de, 247, 247f
sabor dulce de, 254r- 255r
fucosa, 249, 249f
fuentes de energía
de los organismos vivos, 5, 5f solar, 751, 751f
fuerza electromotriz (fem), **518**
fuerza protón motriz, **721**, 722, 722f
rotación de flagelos bacterianos por, 743, 743f
síntesis de ATP impulsada por, 724-727, 726f, 727f
transporte activo impulsado por, 734-735, 734f
fuerzas de London. *Véase* interacciones de van der Waals
fumarasa, 623f, **631**
mutaciones en, 639-640
fumarato hidratasa, 623f, **631**
fumarato, **631**
como oncometabolito, 640
en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684, 684f
hidratación del, 623f, 631
oxidación del succinato a, 623f, 631
función de las proteínas, 75, 76f
catálisis, véase enzimas
celular, 335
desplazamiento, 180f, 181f, 182-183, 182f, 183f
fenotípica, 334
métodos basados en el DNA para el estudio de,
estudios de interacción proteína-proteína, 338-340, 338f, 339f
estudios de relación de secuencia o estructurales, 335-336, 335f, 336f
genotecas, 335, 335f, 336, 336f, 337f, 338f
microchips de DNA, 340-341, 340f, 341f
proteínas de fusión e inmunofluorescencia, 336-338, 337f, 338f
sistemas CRISPR/cas, 341-342, 342f
molecular, 334
principios de, 157-158
unión de ligandos. *Véase* interacciones proteína-ligando
función fenotípica, **334**
función molecular, **334**
funciones celulares, **334**
furanosas, **246**, 247f
fusión, de membranas, procesos biológicos que utilizan, 403-405, 403f, 404f
FXR. *Véase* receptor X de farnesoide,

G

G-actina, 181, 180f
G. Véase contenido de energía libre; energía libre de Gibbs
G. *Véase* guanina
G6PD. *Véase* glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GABA. *Véase* ácido γ-aminobutírico
Gal4p, 1145-1146, 1147f
galactolípidos, **367**, 367f
galactoquinasa, **551**
galactosa, 245, 246f, 246s
en rutas alimentadoras de la glucólisis, 549f, 551-552, 551f
metabolismo en levaduras de, regulación de, 1145, 1146f, 1147t
galactosamina, 249, 249f
galactosemia, **552**, 551-552
galactósido permeasa, **419**, 421f, 420, 422f
gangliósidos, **368**, **368**, 369f, **838**
acumulación anormal de, 371r
síntesis de, 828, 831f
tipo de grupo sanguíneo y, 268-269, 369-370, 370f
GAP. *Véase* proteínas activadoras de la GTPasa
Garrod, Archubald, 698
GAS5. *Véase* detención específica del crecimiento
gases, solubilidades de, 51, 51t
gastrina, **675**, 676f
GC. *Véase* cromatografía de gases
GDGT. *Véase* glicerol dialquil glicerol tetraéteres
GEF. *Véase* factores de intercambio de nucleótidos de guanosina
gel de poliacrilamida, 92-94, 93f, 94f, 95f
gelatina, 130
gen *Abl*, 482
gen APC, mutaciones en, 482-483
gen ATM, mutaciones en, 482-483
gen *ATP6*, 745
gen *bicoid*, 1153-1154, 1154f
gen *Emp4*, 1159r
gen *DCC*, mutaciones en, 482
gen *env*, 1056-1057, 1057f
gen *fte*, 116, 115f
gen *gag*, 1056, 1057f
gen *lacZ*, como marcador de escrutinio, 326, 326f
gen *nanos*, 1154, 1154f, 1155f
gen *NF1*, en cáncer, 443r
gen *Pax6*, 1159r
gen *pol*, 1056, 1057f
gen *PS1*, localización de, 350-351, 351f
gen reportero, 336
Gen *rpoS*, 1136-1138
gen *ubx*, 1156, 1156f
genes bacterianos
cartografía (mapeado) de, 979-980, 980f
convenciones terminológicas para, 980
genes *BRCA1*, mutaciones en, 481
genes codificantes de RNA, en evolución humana, 349, 350f
genes constitutivos, **31**, **1120**
genes de estabilidad, mutaciones en, 481
genes de la regla par, **1153**, 1155, 1155f
genes de polaridad de segmentos, **1153**, 1155, 1155f, 1156f
genes de segmentación **1152**, 1155, 1155f, 1155f
genes de shock calórico, promotores de,1030
genes *GAL*, regulación positiva y negativa de, 1145, 1145f, 1147t
genes gap, **1153**, 1155, 1155f, 1156f
genes homeóticos, **1153**, 1155-1157, 1155f, 1156f
genes *Hox*, 1155.1157, 1155f, 1156f, 1159r
genes inducibles, **1120**
genes maternos, **1152**, 1153, 1154f
genes reprimibles, **1120**
genes saltadores, 1005-1007
genes supresores de tumores, 481, 482-485, 485f
genes vigilantes. *Véase* genes de estabilidad
genes *XP*, 481
genes, **281**, **952**, 952f
bacterianos,
convenciones de nomenclatura, 980
mapeado de, 980, 980f
clonados. *Véase* clonado del DNA
comparaciones de, 335-336, 336f
corte y empalme alternativo de, 1045-1047, 1046f, 1047f
distribución de, 39
hebra codificadora de, 1029, 1029f
genoma anotado, **39**
genoma humano, secuenciación de,
comparaciones con los parientes biológicos más próximos, 347-349, 348f, 349f, 350f
historia de, 343, 345f
historia evolutiva aprendida a partir de, 351-353, 352f, 353r-354r
localización de genes patológicos en, 349-351, 351f
medicina personalizada por el uso del, 344r
tipos de secuencias vistas en, 345-347, 346f, 347f
genomas, **3**, **15**, **37**, **319**
comparaciones de. *Véase* genómica comparativa
humano. *Véase* genoma humano
mitocondrial, 319, 741-742, 742t, 743f
secuencias completas de, 37-39, 38t, 343, 345f
genómica comparada, 39-40, **335**, 336, 336f
genes implicados en enfermedades, 349-351, 351f
historia humana aprendida a partir de, 351-353, 352f, 353r-354r
parientes biológicos más próximos a los humanos, 347-349, 348f, 349f, 350f

Copyrighted Material

genómica funcional, 39
genómica, **15**, **319**
anotación utilizada en, 343-345
comparativa, 39-40, 335-336, 336f
conocimiento de la historia humana a partir de, 351-353, 352f 353r-354r
genes implicados en enfermedades, 349-351, 351f
parientes biológicos más próximos a los humanos, 347-349, 348f, 349f, 350f
historia de, 343, 345f
secuenciación del genoma humano, 343, 345f
comparación con los parientes biológicos más próximos, 347-349, 348f, 349f, 350f
historia de, 343, 345f
historia evolutiva generada a partir de, 351-353, 352f, 353r-354r
localización de genes patológicos en, 349-351, 351f
medicina personalizada mediante el uso de, 344r
tipos de secuencias vistos en, 345-347, 346f, 347f
secuencias completadas, 37-39, 38t, 343, 345f
genoteca de DNA, **324**
estudio de la función proteica mediante, 334-335, 335f, 336, 337f
genoteca, **334**
genotecas, DNA, 334-335, 335f, 336-338, 338f
genotipado del DNA, **306r**, 307r
genotipado, DNA, 306r-307r
geranil pirofosfato, **832**
en la síntesis del colesterol, 832-833, 834f
geraniol, 375
germinación de semillas, gluconeogénesis en, 794-796, 795f
GFP, Véase proteína verde fluorescente
GFR. Véase velocidad de filtración glomerular
Gi. Véase proteína G inhibidora
Gibbs, J. Willard, 22-23
Gilman, Alfred, G., 442r
GIP. *Véase* polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa
giros β, 121t, **123**, 124f
glándulas exocrinas, acuaporinas en, 423
Gleevec. *Véase* imatinib mesylate
gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, **540**, **779**
activación por la luz de, 784-785, 785f
en la ruta glucolítica, 536f, 540-541, 542f
gliceraldehído 3-fosfato, **540**
conversión del 3-fosfoglicerato en, 778-779, 780f
en el ciclo de Calvin, 779-781, 781f, 782f
en la ruta de las pentosas fosfato, 565-567, 565f, 567f
en la ruta glucolítica, 535f, 536, 536f, 540-541, 541f, 542f
gliceraldehído, 244, 244s, 246s
estereoisomerismo de, 244-245, 245f
glicerofosfolípidos, **365**
como lípidos de membrana
ácidos grasos unidos con enlace éter, 366-367, 367f
como derivados del ácido fosfatídico, 365-366, 365f, 366f
degradación en lisosomas de, 370, 370f, 371r
síntesis de,
CDP-diacilglicerol en, 825-827, 826f, 827f
plasmalógeno, 827-828, 830f
precursores de, 820-821, 821f
rutas eucarióticas a la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, y fosfatidilcolina, 827, 828f, 829f
transporte a membranas celulares después de, 829
unión de los grupos de cabeza de los fosfolípidos, 824-825, 825f
glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, **719**, **820**, 821f
en la gliceroneogénesis 823, 823f
transferencia electrónica por, 719, 719f
glicerol 3-fosfato
en la síntesis de sacarosa, 795f, 796
en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, 820-821, 821f
generación en el tejido adiposo de, 823, 823f, 824f
glicerol dialquil glicerol tetraéteres (GDGT), 368, 368f
glicerol quinasa, **650**, 651f, **820**, 821f
glicerol,
en glicerofosfolípidos, 365, 365f
en la síntesis de triacilgliceroles y glicerofosfolípidos, 820, 821f
síntesis de glucosa a partir de, 557, 559f, 563
transporte por acuaporinas de, 424-425
triacilgliceroles como ésteres de ácidos grasos con, 362, 362f
gliceroneogénesis, **563**, **823**
efectos de la tiazolidinadiona sobre, 823-824
glicerol 3-fosfato a partir de, 823, 823f, 824f
regulación de, 823, 824f
glicina sintasa, **866**
glicina, **79**, 79s, **691**, **866**
biosíntesis de porfirinas a partir de, 875-876, 876f, 877f, 878r
biosíntesis de, 866, 866f
catabolismo de, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
como neurotransmisor, 472
curva de titulación de, 81-83, 83f, 84f
en la biosíntesis de purinas, 883, 884f
en la ruta del glicolato, 787, 787f, 790f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
receptores de, 428-430, 472
glicoma, **16**
glifozinas, inhibición del cotransportador paralelo Na+-glucosa por, 423
glimepiride (Amaryl), 924-925, 925s, 943t
glioxilato, **795**,
glioxisomas, **794**
β-oxidación en, 663-664, 664f
glipizide (Glucotrol), 924-925, 925s, 943t
globinas, 159. *Véase también* hemoglobina; mioglobina
globósidos, **368**, 369f
glóbulos blancos. *Véase* leucocitos
GLP-1. *Véase* péptido tipo glucagón-1
glucación de la hemoglobina, **250r**, 251r
glucación, de la hemoglobina, 850r-851r
glucagón, **591**, **925**
en la regulación del colesterol, 840-841, 841f, 842f
en la regulación global del metabolismo glucídico, 609-611, 610f, 611f
movilización de triacilgliceroles por, 649, 350f
regulación de la glucógeno fosforilasa por, 604, 605f, 606f
regulación de la síntesis de triacilgliceroles por, 821-822
regulación del metabolismo energético por, 926-926, 927f, 926t
regulación por hábitos alimentarios, 908f, 909f, 909-910, 910t
secreción pancreática de, 923, 924f, 925f
señalización de cAMP por, 448-450
glucanos, 252. *Véase también* polisacáridos **254**
glúcidos 10f, 16, **243**
análisis de, 274-276, 275f, 276f, 277f
análisis de, 274-276, 275f, 276f, 277f
clases de, 243
en glucoconjugados. *Véase* glucoconjugados
en glucoproteínas, 267, 268f
enlace glucosídico en, 252-263, 252f, 253t, 253f
información transportada por, 263, 269-274, 271f, 272f, 273f, 274f
nomenclatura de, 251-253, 253t
sabor dulce de, 254r-255r
en rutas alimentadoras de la glucólisis 549, 549f
información transportada por, 263, 269-270
interacciones lectina-glúcido, 273, 273f, 274f
lectura por lectinas de, 270-272, 271f, 272f
monosacáridos, 243
centros asimétricos de, 244-245, 245f, 246f
como agentes reductores, 250r-251r, 251-252
derivados de hexosas en organismos vivos, 248-250, 249f
dos familias de, 244, 244f
estructuras cíclicas de, 245-248, 246f, 247f, 248f
símbolos y abreviaturas de, 253t
oligosacáridos, 243, 245
polisacáridos. *Véase* polisacáridos
glucobiología, 269-270
glucocálix, 263
glucoconjugados, **243**, **263**
estructura de, 263, 263f
glucolípidos, 268-269, 269f
glucoproteínas, 88, 263
en direccionamiento de proteínas, 1106-1109, 1107f, 1108f
estructura de, 263f, 267, 268f
modificación postraducción que forma, 1102
información transportada por, 263, 269-270
lectura por lectinas de, 270-272, 271f, 272f
interacciones lectina-glúcido, 273-274, 273f, 274f
lipopolisacáridos, 268-269, 269f
proteoglucanos,
enfermedades humanas en donde intervienen, 266r
estructura y función de, 263-267, 263f, 264f, 265f, 267f
glucocorticoides, **844**, 905
regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por, 823, 824f
síntesis de, 844-845, 844f, 847f
glucoesfingolípidos, **263**, **368**
como lípidos de membrana, 368, 369f
balsas de, 401-402, 401f, 402f
estructura de, 263f
glucoforina, 388, **392**
anclado a la membrana de la, 400-401, 401f
en la membrana plasmática, 392-393, 393f
glucogénesis, **599**
en bacterias, 792
glucogenina en, 602-603, 603f, 604f
regulación de
fosforilación y desfosforilación de la glucógeno sintasa, 607-608, 608f
mediación por GSK3 de la insulina en la, 608-609, 609f
papel del PPI en, 609, 610f
regulación alostérica y hormonal de la glucógeno fosforilasa, 604-607, 605f, 606f
señales alostéricas y hormonales en el metabolismo glucídico global, 609-611, 610f, 611f
UDP-glucosa en, 600-602, 602f, 603f
glucogenina, **602**, 603f, 604f
glucógeno fosforilasa *a*, **604**, 605-607, 605f, 606f
glucógeno fosforilasa *b*, **604**, 605-607, 605f, 606f
glucógeno fosforilasa, **550**, 550-551, 550f
degradación del glucógeno por, 599, 599f, 600f, 606r
regulación alostérica y hormonal de, 604-607, 605f, 606f
regulación de, 231-232, 232f, 236-237, 237f
glucógeno sintasa *a*, **607**, 608f
glucógeno sintasa *b*, **607**, 608, 608f
glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), 463-464, 463f, **607**
acciones de la insulina facilitadas por, 608-609, 609f
autoinhibición de, 468f, 467-468
regulación de la glucógeno sintasa por, 607-608, 608f
glucógeno sintasa, **601**, 602f
en regulación metabólica y control, 585-586, 586f
fosforilación, 232
fosforilación y desfosforilación de, 607-608, 608f
glucógeno, 243, **256**
almacenamiento energético en, 255-257, 256f
degradación del. *Véase* glucogenólisis
en hígado, 912-913, 913f
en las rutas alimentadoras de la glucólisis, fosforólisis de, 550-551, 549f, 550f
hidrólisis de, 549, 549f
en músculo, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
estructuras y papeles de, 262t
gránulos de, 598, 598f
plegamiento de, 258-259, 258f, 259f
regulación global de, 609-611, 610f, 611f
regulación por insulina del, 463-464, 463f
síntesis de. *Véase* glucogénesis
glucogenólisis, **601**
catálisis por la glucógeno fosforilasa de, 599, 599f, 600f, 606r
destinos de la glucosa 1-fosfato después de, 599-600, 601f, 606r-607r
regulación de
fosforilación y desfosforilación de la glucógeno sintasa, 607-608, 608f
mediación por GSK3 de la insulina en la, 608-609, 609f
papel del PPI en, 609, 610f
regulación alostérica y hormonal de la glucógeno fosforilasa, 604-607, 605f, 606f
señales alostéricas y hormonales en el metabolismo glucídico global, 609-6011, 610f, 611f
glucolípidos neutros, **368**, 369f
glucolípidos, 268-269, 269f, 364f-365f, **365**
glucólisis aeróbica, **545**, **618**
glucólisis, 533-534, 533f, **534**

acoplamiento de formación de ATP y NADH a la, 537
aeróbica, 545, 618
bioenergética de, 558, 558t, 562, 562t
en diabetes mellitus tipo 1, 545, 548f
en el hígado, 912, 913f
en tumores, 545, 546r-547r, 618
entrada de la glucosa 1-fosfato en, 599-600, 601f, 606r-607r
entrada del glicerol en, 650, 651f
fase de beneficios de 535f, 536, 540
conversión del 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato, 536f, 543-544, 543f
deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, 536f, 544
oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, 536f, 541-543, 542f
transferencia de fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, 536f, 541-543
transferencia de grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP, 536f, 544
fase preparatoria de, 534-536, 535f
conversión de la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato, 536f, 538-539, 539f
fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bisfosfato, 536f, 539-540
fosforilación de glucosa, 536f, 538
interconversión de triosas fosfatos, 536f, 540, 542f
rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato, 536f, 540, 541f
ganancia neta de ATP en, 544
intermediarios fosforilados en, 537-538
pasos de la gluconeogénesis compartidos con, 558, 559f
piruvato formado por, 533-534, 533f, 535f
destinos de, 536-537, 537f, 618
energía remanente en, 537
por transferencia de grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP, 536f, 544
regulación de, 545, 546r-547r, 563
ATP en la inhibición alostérica de la piruvato quinasa, 592-593, 593f, 594f
conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato, 593-594, 593f, 594f
coordinación de la gluconeogénesis con, 587, 587f
fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación alostérica de PFK-1 FBPasa-1, 591-592, 591f, 592f
regulación recíproca de PFK-1 y FBPasa-1, 590-591, 590f
regulación transcripcional de hexoquinasa y glucosa 6-fosfatasa, 589-590,
regulación transcripcional del número de moléculas decenzima, 594-598, 595t, 594f, 596f, 597r
respuestas de los isozimas de la hexoquinasa a la glucosa 6-fosfato, 588-589, 588r, 589f
xilulosa 5-fosfato como regulador clave en, 592, 593f, 594f
reparto de la glucosa 6-fosfato entre la ruta de las pentosasfosfato y, 568, 568f
rutas alimentadoras de
glucógeno y almidón, 550-551, 550f
monosacáridos, 549f, 550-552, 551f
polisacáridos y disacáridos, 549, 549f
glucómica, **268**
gluconeogénesis, 533-534, 533f, **557**, **587**
a partir de intermediarios del ciclo del ácido cítrico y de aminoácidos, 562-563, 563t
ácidos grasos y, 563
bioenergética de, 558, 558t, 562, 562t
conversión de fructosa 1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato, 561
conversión de glucosa 6-fosfato en glucosa, 562
conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato, 558-561, 560f, 561f
en semillas en germinación, 794-796, 796f
gasto energético de, 562, 562t
pasos de la glucólisis compartidos por, 558, 559f
precursores de, 557, 559f
regulación de, 563-594
ATP en la inhibición alostérica de la piruvato quinasa, 592-593, 593f
conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato, 593-594, 594f
fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación alostérica de la PFK-1 y FBPasa-1, 591-592, 591f, 592f
coordinación de la glucólisis con, 587, 587f
respuesta de los isozimas de la hexoquinasa a la glucosa 6-fosfato, 588-589, 588r, 589r
regulación recíproca de fosfofructoquinasa-1 y fructosa 1,6-bisfosfatasa, 590-591, 590f
regulación transcripcional de hexoquinasa y glucosa 6-fosfatasa, 589-590
regulación transcripcional del número de moléculas de enzima, 594-598, 595t, 594f, 596f, 597r
xilulosa 5-fosfato como regulador clave en, 592, 593f
Glucophage. *Véase* metformín
glucoproteínas, **88**, **263**
en direccionamiento de proteínas, 1106-1109, 1107f, 1108f
estructura de, 263f, 267, 268
modificación postraducción que produce, 1102
glucoquinasa. *Véase* hexoquinasa IV
glucosa 1-fosfato, **598**
degradación del glucógeno a, 598-599, 599f, 600f
destinos de, 599-600, 601f, 606fb-607r
en la síntesis del almidón, 792
en la síntesis del glucógeno, 601
glucosa 6-fosfatasa, **562**
en la degradación del glucógeno a glucosa, 599-600, 601f
regulación trasncripcional de, 589-590
glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), **565**
deficiencia de, 566r en la ruta de las pentosas fosfato, 564, 564f
regulación por la luz de, 785
glucosa 6-fosfato, 249f, 250, **538**, **573**
conversión de la glucosa 1-fosfato en, 599-600, 601f
destinos múltiples de, 573
en glucólisis, 535f, 536, 536f, 538-539, 539f
repartimiento entre ruta de las pentosas fosfato y, 568, 568f
en gluconeogénesis, conversión en glucosa, 562
en la ruta de las pentosas fosfato, 564-565, 564f, 565-568, 564f565f, 567f, 568f
en la síntesis de glucógeno, 601
metabolismo hepático de, 911-913, 913f
respuesta de los isozimas de la hexoquinasa a, 588-589, 588r, 589f
repartimiento entre glucólisis y, 568, 568f
glucosa sanguínea elevada, neutralización por la insulina de, 923, 923t, 924t
glucosa sanguínea, 921-922, 922f
concentración de
caída de, 581
medidas de, 250r-251r, 931
regulación global de, 609-611, 610f, 611f
regulación hormonal de, 922-923
adrenalina en, 929, 929t
cortisol en, 930
diabetes mellitus y, 930-931
durante ayuno e inanición, 927-929, 927t, 928f, 929f
efectos de la insulina en, 923, 923t, 924f
efectos del glucagón en, 925-926, 926t, 927f
secreción de insulina por las células β pancreáticas en, 923-925, 925f, 926f
reposición por el hígado de, 912, 913f
reposición por la glucosa 1-fosfato de, 599-600, 601f, 606r-607r
glucosa, 243-245, 244s, 246s
como azúcar reductor, 250r-251r, 251
conversión de ácidos grasos en, 563
conversión de aminoácidos en, 688f, 686
conversión de glucosa 6-fosfato en, 562
degradación anaeróbica de. *Véase* fermentación
derivados biológicos de, 248-250, 249f
en celulosa, 257, 257f, 796-797, 796f en el almidón, 255-256, 256f, 792
en glucógeno, 256, 256f
en la regulación de la oxidación de ácidos grasos,659, 659f
epímeros de, 246, 246f
formas cíclicas de, 245-247, 247f, 248f
fosforilación de, como primer paso de la ruta glucolítica, 536f, 538
glucógeno fosforilasa como sensor de, 604, 605f
metabolismo hepático de, 911-913f
necesidades cerebrales de, 581. 920-921, 920f
niveles sanguíneos de. *Véase* glucosa en sangre
reacción de la hexoquinasa con, 221-222, 221f
regulación del operón *lac* por, 1130-1131, 1131f
regulación global de, 609-611, 610f, 611f
regulación por la insulina de, 463-464, 463f
rutas principales de, 533-534, 533f
sabor dulce de, 254r-255r
síntesis de. *Véase* gluconeogénesis
transporte por el cotransportador paralelo Na^+-glucosa de, 421-422, 421f, 422f
glucosamina, 249, 249f
en paredes celulares de bacterias y algas, 259-260, 260f
glucosaminoglucanos, **260**
en ECM, 260-262, 261f
en proteoglucanos, 263-267, 263f, 264f, 265f, 267f
enfermedades humanas que implican, 266r
glucosidasas, 257
análisis de glúcidos mediante, 275
glucósidos, 252
glucosil (4⟶6) transferasa, 601, 603f
glucosil fosfatidilinositol (GPI), 392
como ancla de proteínas de membrana, 395-397, 396f. *Véase también* proteínas ancladas con GPI
glucosilación, 267-268, 268f
en direccionamiento de proteínas, 1106-1109, 1107f, 1108f
glucosuria, **930**
Glucotrol. *Véase* glipizide
glupicanos, **264**, 264f
GLUT1. *Véase* transportador de glucosa 1
GLUT2. *Véase* transportador de glucosa 2
GLUT3. *Véase* transportador de glucosa 3
GLUT4. *Véase* transportador de glucosa 4
glutamato deshidrogenasa, 861
glutamato sintasa, **861**, 560-861
glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), 684
ensayos de daño tisular mediante, 686r
glutamato-piruvato transaminasa (GPT), 680, 581
ensayos de daño tisular mediante, 686r
glutamato, 79s, **81**, **698**, **860**, **864**
asimilación de amoníaco sobre, 860-861
como neurotransmisor, 472
curva de valoración de, 85, 85f
en catálisis ácido-base general, 199f
metabolismo de, 674, 674f
degradación del esqueleto carbonado, 688f, 698, 698f
formación por reacciones de transaminación, 677, 677f, 678f, 679f
liberación de grupos amino como amoníaco, 677-678, 680f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
síntesis de neurotransmisores a partir de, 880-882, 881f
glutamina amidotransferasas, **862**, 863f
inhibición de, 894, 893f
glutamina sintetasa, 236-238, **679**, 680f, **860**
como punto de regulación primario en el metabolismo nitrogenado, 861-862, 861f, 862f
glutamina, 79s, **80**, 81, **698**, **860**, **864**
asimilación de amoníaco sobre, 860-861
biosíntesis de histidina a partir de, 871-873, 874f
en la bioasíntesis de purinas, 883, 884f
gluconeogénesis a partir de, 562-563, 563t
metabolismo de, 674, 675f
degradación del esqueleto carbonado, 688f, 698-699, 698f
transporte de amoníaco en el torrente circulatorio, 678-679, 680f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
glutaminasa, **679**, 680f
glutarredoxina, **888**
en la síntesis de desoxirribonucleótidos, 888, 888f
glutatión (GSH), **87**
biosíntesis de, 878-879, 879f
glutatión peroxidasa, **273**, **879**
glyburide (Micronase), 924, 943t
GMP cíclico fosfodiesterasa (cGMP PDE), 466
en la señalización de la visión, 456-458, 456f, 456f, 457f, 458r
GMP cíclico. Véase guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GMP. *Véase* guanilato
Goldstein, Joseph, 839, 846r
G_{olf}, 458
GOT. *Véase* glutamato-oxalacetato transaminasa
gota, exceso de ácido úrico produce, 893, 894, 893f, 894f
gotículas de lípido, **649**
GPCR. *Véase* receptores acoplados a proteína G
GPT. *Véase* glutamato-piruvato transaminasa
G_q, **450**

Copyrighted Material

gradiente de concentración, transporte activo contra, 412-413, 412f
gradiente electroquímico, **406**, 406f
transporte activo contra, 412-413, 412f
gradiente protónico
en el complejo citocromo bc_1, 766f, 765-766
en el flujo electrónico y fosforilación, 769-770, 770f
en la fosforilación oxidativa, 707-708, 707f
creación de la cadena respiratoria mitocondrial de, 720-722, 722f
liberación de ATP impulsada por, 728, 729f
moción rotacional producida por, 731-733, 732f, 733f, 733r
síntesis de ATP impulsada por, 724-727, 725f, 726f, 727f
transporte activo energizado por, 734-735, 734f
gradientes iónicos, transporte activo secundario mediante, 418-422, 418t, 421f, 422f
gráfica de dobles recíprocos, **204**, 204r
de inhibidores enzimáticos, 211r
gráfica de Ramachandran, **119**, 119f
de estructuras secundarias de proteínas, 124f, 125
gránulos secretorios, hormonas peptídicas en, 904
grasas de la dieta, absorción de, 648-649, 648f, 649f
grasas neutras. *Véase* triacilgliceroles
grasas-STATS, 933-934, 934f
grasas. *Véase* triacilgliceroles
Grb2. *Véase* proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento
Greider, Carol, 1059
grelina, 909, 909f, 910t, 938
regulación de la masa corporal por la, 938-939, 939f
GRK. *Véase* receptor acoplado a proteínas G quinasas
GRK2. *Véase* receptor β-adrenérgico quinasa
gRNA. *Véase* RNA guías
growth arrest specific 5 (GAS5), 1148
Grunberg-Manago, Marianne, 1054
grupo 5'-desoxiadenosilo, 660r
grupo de alta movilidad (HMG), 1144, 1145f
grupo fosforilo, 504-506, 505f, 513-514, 513f
papel en la glucólisis del, 537-538
grupo peptídico, **118**, 118f
grupos acilo
en bicapa lipídica, estados ordenados de, 397-398, 398f, 398t
transferencia de, 504-505
grupos adenililo, donación por ATP de, 513-514, 513f
grupos amino
destinos metabólicos de, 674, 675f
degradación enzimática de las proteínas de la dieta, 675-677, 676f
liberación de amoníaco del glutamato, 677-678, 680f
toxicidad del amoníaco y, 680-681
transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato, 677, 677f, 678f, 679f
transporte de amoníaco por alanina, 680, 681f
transporte de amoníaco por la glutamina, 678-679, 680f
en el ciclo de la urea. *Véase* ciclo de la urea
grupos carbonilo, 502- 503, 503f
en el ciclo del ácido cítrico, 622-624, 624f
en la oxidación de ácidos grasos, 654, 655f
en la síntesis de ácidos grasos, 809f, 810
grupos exteriores, **349**
grupos funcionales, en biomoléculas, 12-13, 13f, 14f, 15f
grupos glucosilo, transferencia de, 504-506
grupos pirofosforilo, donación por el ATP de, 513-514, 513f
grupos prostéticos, **88**, 89t, **190**
adición postraducción de, 1103
grupos R aromáticos, 79-80, 79f, 80f, 80r
grupos R básicos, 79f, 81
grupos R cargados negativamente, 79f, 81
grupos R cargados positivamente, 79f, 81
grupos R, **76**
de aminoácidos, 76, 76f, 77t, 78
apolares, alifáticos, 79, 79f
aromáticos, 79-80, 79f, 80f, 80r
cargados negativamente, 79f, 81
cargados positivamente, 79f, 81
polares, sin carga, 79f, 80-81, 81f
grupos salientes, activadores, 505-506, 505f
G_s. *Véase* proteína G estimuladora
GSH. *Véase* glutatión
GSK3. *Véase* glucógeno sintasa quinasa 3
GTP. *Véase* guanosina trifosfato
GTPasa, de proteínas G, 441, 446f, 444r-446r, 448, 457, 459
guanilato (GMP), 283s, 514
biosíntesis de, 883-885, 883f, 884f, 885f
degradación de, 891-894, 892f, 893f, 894f
guanilil ciclasas de receptor, 465-466, 465f
guanilil ciclasas, receptor, 465-466, 465f
guanulina, **466**
guanina (G), 282, 282s, 282t
apareamiento de bases de, 286, 287
biosíntesis de, 883-885, 883f, 884f, 885f
degradación de, 891-894, 892f, 893f, 893f, 894f
desaminación de, 298, 298f
metilación de, 300-301
guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico cGMP), 465s
como molécula reguladora, 312, 313f
en señalización por la guanilil ciclasa, 465, 465f
guanosina trifosfato (GTP)
como portador de energía química, 311-312, 311f, 312f
en inicio, 1089, 1093f
en la reacción de la succinil-CoA sintetasa, 623f, 629-630, 629r, 630f
en mRNA eucarióticos, 1040-1041, 1040f
guanosina, 283s
Guillemin, Roger, 900
gustducina, 458
gusto, señalización por GPCR en, 458

H

H. Véase entalpía
H^+ ATPasa, estructura de, 414f, 415
H2AX, 970
H2AZ, 970
H_4 folato. *Véase* tetrahidrofolato
hábitats anaeróbicos, **5**
arquea y bacteria en, anammox por, 854, 854f, 856r, 857r
fermentación en, 537
ácido láctico, 537, 537f, 552-553, 554f
alimentos y productos químicos industriales producidos por, 555-557
etanol, 537, 537f, 553, 553f, 556r
tiamina pirofosfato en, 555, 555f, 558t
hábitos alimentarios, regulación hormonal de, 908-909, 909f, 910t. *Véase también* regulación de la masa corporal
hábitos comensales. *Véase* hábitos alimentarios
HAC. *Véase* cromosomas artificiales humanos
Haldane, J. B. S., 190, 197, 202
haplotipos, **347**
humanos, 347, 347f
haptenos, **176**
Harden, Arthur, 538
Hartley, B. S., 217
HAT. *Véase* histona acetiltransferasas
Hatch, Marshall, 789
Hb. *Véase* hemoglobina
HbS. *Véase* hemoglobina S
HCR. *Véase* represor controlado por hemina
HDAC. *Véase* histona desacetilasas
HDL. *Véase* lipoproteína de alta densidad
hebra codificante, 1029, 1029f
hebra conductora, **983**, 983f
síntesis de, 990-993, 991f
hebra molde, **981**
para la replicación del DNA, 981, 983, 984f
para la transcripción, 1029, 1029f
hebra no molde, 1029, 1029f
hebra rezagada, **983**, 983f
síntesis de, 991-993, 991f
hebras antiparalelas, **288**, 289f
hebras complementarias, **289**
hebras paralelas, **288**, 289f
helicasa DnaB, 1010
en la elongación de la replicación, 990-991, 991f, 992f, 992t
en el inicio de la replicación 989, 989t, 990f
helicasas, **987**
en replicación del DNA, 987-990, 989t, 990f
en reparación de apareamientos incorrectos, 999, 1000f
hélice anfipática, **409**, 409f
hélice α, 120f, **121**, 121r, 121t
en proteínas de membrana, 394-395
secuencia de aminoácidos y estabilidad de, 122-123, 122f, 122t
hélice-bucle-hélice básico, **1128**, 1129f
hélice-giro-hélice, **1126**, 1126f, 1127
Helicobacter pylori, lectinas de, 271, 272f
hemiacetales, **245**
formación de, 245-247, 247f
hemicetales, **245**
formación de, 245-247, 247f
hemo en, 158-159, 158f
hemo oxigenasa I(HO), 876, 877f, 878
hemo, 133, 113s, **158**
degradación de, 876-878, 877f
del Complejo II, 715, 716f
en citocromos, 711, 711f
en los enzimas citocromo P-450, 740
estructura de, 158-159, 158f, 159f
glicina en biosíntesis de, 875-876, 876f, 877f, 878r
influencias de la estructura proteica sobre, 162-163, 162f
unión de oxígeno a, 158-159, 158f, 159
hemocitoblastos, **163**
hemofilias, 236, 236f
hemoglobina (Hb), 87, 87t, **158**
en anemia falciforme, 172-174, 172f, 173f
estructura de, 141, 142f
subunidades, 163-164, 163f, 164f
función de, 159 hemo en, 158-159, 158f
transporte de CO_2 por, 170-171, 170f
transporte de ion hidrógeno por, 170-171, 170f
transporte de oxígeno por, 163
unión de agua en, 54-55, 55f
unión de monóxido de carbono por, 168r-169r
unión de oxígeno por
cambios de conformación después de, 164, 165f, 166, 166f, 167f
descripción cuantitativa de, 166-167, 167f
efectos del pH sobre, 170-171, 170f
gráfica de Hill para, 167, 167f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
naturaleza cooperativa de, 165-166, 166f, 167f
regulación de, 171-172, 171f, 172f
hemoglobina en, 163
intercambiadores iónicos de, 410-412, 412f
papel de las lectinas en la degradación de, 270
transportadores de glucosa en, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
hemoglobina S (HbS), 172-174, 172f, 173f
Henri, Victor, 201
Henseleit, Kurt, 682
heparán sulfato, **261**, 261f, 264-265, 264f, 265f
unión a la trombina y, 265-266, 265f
heparinas, 236, 261f, 262
hepatocitos, 911
Herceptina. *Véase* trastuzumab
herencia, mitocondrial, 743-744, 744f
heterocromatina, **972**, **1140**
heteroplasmia, **744**
en herencia mitocondrial, 744, 744f
heteropolisacáridos, **254**, 254f, 255
en las paredes celulares de bacterias y algas, 259-260, 260f
glucosaminoglucanos, 260-262, 261f
heterótrofos,
ciclado de carbono, oxígeno y agua por, 491-492, 492f
ciclado del nitrógeno por, 492, 492f
hexoquinasa I, **589**, 589f
hexoquinasa II, **588**, 589
hexoquinasa IV, 59, **589**, 589f, 911
defectos en, 598
regulación transcripcional de, 589-590
hexoquinasa, **538**
clasificación de, 191
en la ruta glucolítica, 536f, 538-539
en regulación y control metabólicos, 576-577, 580, 583, 583f, 585-586, 586f
inhibidores de, para el tratamiento del cáncer, 546r-547r
mecanismo de, 221-222, 221f
regulación de, respuesta de los isozimas a la glucosa 6-fosfato, 588-589, 588r, 589f
hexosas fosfato, movimiento de, 798f, 799
hexosas, **244**, 244f
centros asimétricos de, 244-245, 245f, 246f
en organismos vivos, 248-250, 249f
hialuronano, **261**, 261f
en agregados de proteoglucano, 266-267, 267f
estructuras y papeles de, 262t
hialuronidasa, 261

hibernación.
oxidación de ácidos grasos durante, 656r
producción de calor mitocondrial durante, 740
hibridar (annealing), **296**
DNA, 295-298, 297f
hidracina, 857
hidrocortisona, 930
hidrogenación parcial, de aceites de cocina, 363, 363f
hidrogenación, de aceites de cocina, 363, 363f
hidrolasas, **69**, 191t
hidrólisis
ATP, 507-509, 508f
compuestos fosforilados y tioésteres, 509-510, 509f, 511f, 511t
de bombeado por simport, 422
de enzimas metabólicos, 578-580, 579t
de formación del enlace peptídico, 1099
de reacciones de oxidación-reducción, 520-521, 521t
del paso transmembrana, 406-407, 407f
efectos de la concentración de reactivo y producto sobre, 449-500
hidrólisis del enlace fosfodiéster, 1051
hidrólisis específica de lípidos, 381-382
hidrólisis, **69**
cambios de energía libre estándar de, 499t
de polisacáridos y disacáridos, para la glucólisis, 545-549, 549f
del ATP
energía libre de, 507-509, 508f, 508t
inhibición inducida por la hipoxia de, 737, 738f
determinación de la estructura de lípidos mediante, 381-382
terminación de la señal cAMP por, 445f, 448
variación de energía libre de
para el ATP, 507-509, 508f, 508t
para compuestos fosforilados y tioésteres, 509-510, 510f, 511f, 511t
β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), **666**, 832
en la síntesis de colesterol, 831-832, 832f, 833f
en la formación de cuerpos cetónicos, 667, 667f
β-hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH), 809, **810**
β-hidroxiacil-CoA (3-hidroxiacil-CoA), 653f, **654**
β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, **654**
en la regulación de la oxidación de ácidos grasos, 659, 659f, 662
hidroxilasas, 821r
hielo, enlaces de hidrógeno en, 48-49, 49f
hierro, 626r-627r
en hemo, 158-159, 158f, 159f
HIF-1. *Véase* factor de transcripción inducible por hipoxia
hígado
efectos de la adrenalina sobre, 929, 929t
efectos de la insulina sobre, 923, 924f, 923t
efectos del glucagón sobre, 925-928, 927f, 927t
en el estado bien alimentado, 923, 924f, 923t
en el estado de ayuno,925-928, 927f, 927t
en el estado de inanición, 927-929, 927t, 928f, 929f
formación de cuerpos cetónicos en, 666-667, 667f, 668f
funciones metabólicas de, 910-911, 912t
metabolismo de aminoácidos, 913-914, 913f
metabolismo de azúcares, 911-912, 913f
metabolismo lipídico, 914, 914f
glucógeno en, 598-599
isozimas de la hexoquinasa del, 588-589, 588r, 589f
liberación de grupos amino del glutamato en, 677-678, 680f
regulación glucídica en, 609-611, 610f, 611f
reparto de colesterol al, 836-838, 839f
transportadores de glucosa del, 409-410
transporte de amoníaco al, 680, 681f
Hill, Archibald, 166
hiperamonemia, 686
hipercolesterolemia familiar (FH), **839**, 843
hiperglicinemia no cetótica, 692
hiperinsulinemia congénita, 925
hiperinsulinismo infantil, 125
hipertensión, defectos de proteína G en, 443r
hiperventilación, 66
hipófisis anterior, **907**, 907f
hipófisis posterior, **907**, 907f, 908f
hipotálamo, 907
AMPK en, 935
regulación de la masa corporal por, 932, 932f
señalización de abajo arriba, 908-909, 908f, 909f, 910t
señalización de arriba abajo, 907-908, 907f, 908f, 909f
hipótesis de la toxicidad de lípidos, 941, 942f
hipótesis del balanceo (wobble), **1076**, 1076f, 1077, 1077f
hipótesis del estado estacionario, **203**
hipótesis del mundo RNA, 34-35, 35f, **1062**
ribointerruptores como vestigio de, 1137
síntesis dependiente de RNA como clave para, 1062-1065, 1062f, 1063r, 1064f
hipótesis un gen-un enzima, **952**
hipótesis un gen-un polipéptido, **952**
hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, **892**
hipoxantina, 891, 892f, 893-894, 893f, 894f
hipoxia, **172**, **537**
fermentación ácido láctica durante, 537
inhibición de la ATP sintasa durante, 737, 738f
producción de ROS durante, respuestas adaptativas para, 737-739, 738f
HIRA, 970r
His distal, **162**, 163
His próxima, **159**
histamina, **880**, 881
histidina quinasa de receptor, **474**
en señalización bacteriana, 474, 475f
histidina, 79s, **81**, **698**, **871**
biosíntesis de, 871-873, 874f
catabolismo de, 688f, 698, 698f
como tampón, 65, 65f
curva de titulación de, 85, 85f
en catálisis ácido-base general, 199f
propiedades y convenciones asociadas con, 77t
síntesis de histamina a partir de, 880, 881f
histona acetiltransferasas (HAT), **1140**, 1141
histona desacetilasas (HDAC), **1140**
histona desmetilasas, inhibición por 2-hidroxiglutarato de, 639f, 640
histonas, **966**
en nucleosomas, 966-967, 967f, 968f, 969f
variantes, 970r-971r, 1140-1141, 1141t
tipos y propiedades de, 967, 967t
Hitchings, George, 893, 894, 895, 996
HMG-CoA reductasa, **832**
en la síntesis de colesterol, 831, 832f
inhibidores de, 845, 845r-846r
regulación de, 840-843, 841f, 842f
HMG-CoA sintasa, **832**
en la síntesis de colesterol, 831, 832f, 833f
en la formación de cuerpos cetónicos, 667, 667f
HMG-CoA. *Véase* β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA
HMG. *Véase* grupo de alta movilidad
HO. *Véase* hemo oxigenasa
Hoagland, Mahlon, 1070
Hodgkin, Dorothy Crowfoot, 660r-661r
hoja β, **123**, 123f
Holley, Robert, 1070, 1084
Holobacterium salinarum, bacteriorrodopsina en, 773, 774f
holoenzima, **190**
homeodominios, **1127**, 1127f
homeostasis, **575**
homeóticos, 1153, 1155-1157, 1156f
Homo neanderthalensis, secuenciación del genoma del, 351-353, 352f, 353r-354r
homocisteína, 691
homocistinuria, 694t
homogentisato deshidrogenasa, 696f, **697**
homólogos, 38
homólogos, **98**, **106**
homoplasmia, **744**
homopolisacáridos, **254**, 254f, 255
formas de almacenamiento energético de, 255-257, 256f
papeles estructurales de, 257-258, 257f, 258f
plegamiento de, 258-259, 258f, 259f, 260f
hongos, variaciones del código genético en, 1074r-1075r
Hoogsteen, Karst, 292
hormona adrenocoticotropa (ACTH, corticotropina), 906-908, 909f
señalización del c AMP por, 450
hormona antidiurética, 909f
regularión hídrica por, 411r, 423
hormona estimuladora de los α-melanocitos (α-MSH), **933**, 933f
hormona liberadora de corticotropina, 907, 909f
hormona liberadora de tirotropina (TRH), 910s
células que responden a, 437
descubrimiento de, 900, 902f
hormona luteinizante, reconocimiento por lectina de, 270
hormonas autocrinas, **903**
hormonas de la vitamina D, 905
hormonas endocrinas, **903**
hormonas esteroides, **905**, *Véase también* hormonas específicas
clase de, 905
como derivados del colesterol, 372, 374, 374f, 834, 835f, 844, 844f, 847f
papel señalizador de, 372, 374, 374f
regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por, 623, 624f
regulación génica eucariótica por, 1146-1148, 1148f, 1157f, 1167t
señalización de receptor nuclear por, 473-474, 473f
síntesis de,
síntesis por citocromo P-450 de, 740-741, 741f, 817r
hormonas icosanoides, 904
clase de, 904-905
hormonas paracrinas, **903**
hormonas peptídicas anorexigénicas, estmulación por leptina de, 933, 933f
hormonas peptídicas, **903**. *Véase* también hormonas específicas
clases de, 903-905, 904f
reconocimiento por lectinas de, 270
hormonas retinoides, **906**
clase de, 906
señalización del receptor nuclear por, 472-473, 473f
hormonas sexuales, 905
como derivados del colesterol, 374, 374f
síntesis de, 844-845, 844f, 847f
hormonas tiroides, **906**
clases de, 906-907, 906f
señalización de receptores nucleares por, 473-474, 473f
hormonas trópicas (tropinas), **907**, 907f
hormonas, **899**. *Véase también* hormonas específicas
clases químicamente diversas de, 903, 903t
catecolaminas, 904
esteroides, 905
icosanoides, 904-905
NO, 906
péptidos, 903-904, 904f, 905f
retinoides, 906
tiroides, 906, 906f
vitamina D, 905-906
detección y purificación de, 900-902, 901r, 902f
en el sistema neuroendocrino, 900, 900f
jerarquía de señalización de arriba abajo, 907-908, 907f, 908f, 909f
liberación de, 907-908, 907f, 908f, 909f
lípidos como
esteroides, 372, 374, 374f
icosanoides, 373-374, 373f
vitaminas A y D, 375-377, 375f, 376f, 377f
movilización de triacilgliceroles por, 649-650, 650f, 651f
receptores celulares de, 902-903, 903f
reconocimiento por lectina de, 270
regulación por. *Véase* regulación hormonal
señalización de abajo arriba por, 908-909, 908f, 909f, 910t
señalización de la guanilil ciclasa por, 465-466, 466f
señalización de receptores nucleares por, 473-474, 473f
señalización GPCR por, 440, 440f
Ca^{2+} como segundo mensajero de, 450-454, 451t, 454f, 455f, 455t cAMP
como segundo mensajero de, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r, *Véase también* receptores adrenérgicos defectos en, 440-441, 444r
diacilglicerol e IP_3 como segundos mensajeros de, 450-451, 451t, 454f
rasgos universales de, 458-460, 459t, 459f, 460f
señalización RTK por, 460
INSR, 460-465, 451f, 462f, 463f, 464f, 465f
transporte por la sangre de, 921-922, 921f, 930f
horquilla de replicación, **982**, 982f, 991, 992
en bacterias, 982-983, 983f, 990, 991f
en eucariotas, 994-996
reparación de, 1008-1009, 1008f
horquillas, **292**
en el DNA, 291-293, 291f
en la horquilla de replicación, **982**, 982f
en el RNA, 293-295, 294f

en la terminación de la transcripción, 1033-1034, 1035f
HPLC. *Véase* cromatografía líquida de alta resolución
HRE. *Véase* elementos de respuesta hormonal
HSR1. *Véase* choque calórico RNA 1
huella, **1032r**
Human Genome Project, 305
Hycamtin. *Véase* topotecan

I

IAPP. *Véase* polipéptido amiloide de los islotes
ibuprofeno, inhibición de las síntesis de prostaglandinas por, 373f, 374, 819
icosanoides
papel de señalización de, 373-374, 373f
síntesis de, 818-820, 818f, 819f
icosatetranoato. *Véase* araquidonato
ictericia, 878
IF. *Véase* factores de inicio
Ig. *Véase* inmunoglobulinas
IgA. *Véase* inmunoglobulina A
IgD. *Véase* inmunoglobulina D
IgE. *Véase* inmunoglobulina E
IgG. *Véase* inmunoglobulina G
IgM. *Véase* inmunoglobulina M
imatinib mesylate (Gleevec), 484r, 547r
IMP. *Véase* inosinato
importinas,1109, 1110f
inactivación o alteración CRISPR/Cas de, 341-343, 342f
eucarióticos, 953-955, 954t, 955f
complejidad de, 955-957, 956f, 957t
implicados en enfermedad, localización de, 349-351, 351f
mutagénesis dirigida, 330-331, 331f
inactivadores basados en el mecanismo, **212**, 212f, 213r-214r
inactivadores suicidas, **212**, 212f, 213r-214r
inanición
metabolismo energético durante, 927-929, 927t, 928f, 929f
producción de cuerpos cetónicos durante,667-668, 668f
reciclado de triacilgliceroles durante, 822, 822f
sistema de la leptina y, 934
incretinas, 908f, **909**, 909f , 910t
índice de masa corporal (BMI), **931**
índice hidropático, **394**
de aminoácidos, 77t
de secuencias proteicas de membrana, 394, 395f
indinavir, 221f
indirubin, 484r
inducción, **1120**
inducibles, 1120
inductores, del operón *lac*, 1124
infarto de miocardio,
ensayo de enzimas hepáticos para, 682-684, 686r
isozimas de la LDH como marcadores de, 588r
infección, papel de la selectina en, 270-272, 271f, 272f
información epigenética, **970r**
en variantes de histonas, 970r-971r
información genética, 949-950
almacenamiento en el DNA de, 287-289, 288f, 289f
ingeniería genética, **320**, Véase también clonado del DNA,
DNA recombinante,
inhibición acompetitiva, **210**
inhibición concertada, **873**
inhibición por IF1 de la ATP sintasa, 737, 738f
Inhibición por retroalimentación, **29**
en biosíntesis de aminoácidos, 875
en biosíntesis de pirimidinas, 886-887, 887f
en biosíntesis de purinas, 883, 885f
en señalización hormonal, 908
inhibición reversible, **210**, 211-212, 210f, 211r, 211t
inhibición, 209
irreversible, 212-214, 212f, 213r-214r, 215f
por antibióticos, 225-227, 226f, 227f
reversible 210-212, 210f, 211r, 211t
tratamiento del VIH basado en,220-221, 220f, 221f
inhibidor acompetitivo, **210**, 210f, 211r
inhibidor competitivo, **210**, 211, 210f, 211r
inhibidor mixto, **211**, 210f, 211r
inhibidor nocturno, 777-779
inhibidor pancreático de tripsina, 232-233n **676**
inhibidor proteico del factor tisular (TFPI), **235**
inhibidores de la transcriptasa inversa, 1059r
inhibidores de proteasa, para VIH, 220, 220f, 221f
inhibidores irreversibles, **212**, 212f, 213-214, 213r-214r, 215f
iniciador (Inr), 1142, 1143f, 1145f
iniciativa ENCODE, 346
inicio, **1089**
de la síntesis de proteínas, 1080, 1080f, 1081t, 1088f 1089, 1089f
en células eucarióticas, 1093-1095, 1094f, 1095f, 1096t
tres pasos de, 1089-1093, 1093f, 1094f t
ranscripción, regulación de. *Véase* regulación génica
inmunofluorescencia, **336**
localización de proteínas por, 336-338, 337f, 338f
inmunoglobulina D (IgD), **177**
inmunoglobulina E (IgE), **177**
en la respuesta alérgica, 177
inmunoglobulina G (IgG), **176**
estructura de, 175f, 176
fagocitosis de, 176f, 177
unión de anticuerpos por, 175f, 176-177, 176f
inmunoglobulina M (IgM), 176f, **177**
inmunoglobulinas (Ig), **174**, 175-176
cadenas ligeras, 175, 176-177, 176f
recombinación en, 1020-1021, 1020f
cadenas pesadas, 175f, 176-177, 176f
recombinación en, 1020-1021, 1020f
recombinación de genes de, 1020-1021, 1020f, 1021f
sitios de unión de antígeno de, 175f, 176-177, 176f
inmunoglobulinma A (IgA), **177**
inmunoprecipitación de cromatina 970r-971r
inmunoprecipitación, **338**, 338f, 339f, 339
cromatina, 970r-971r
inorgánico pirofosfatasa, **513**, 793
inosina, 1048
inosinato (IMP), 883
en biosíntesis de nucleótidos, 883-885, 884f, 885f
inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), **450**, 450s
como señal intracelular, 372-373
como segundo mensajero, 450-451, 451t, 454f
Inr. *Véase* iniciador
insectos, expresión de proteínas recombinantes en, 329, 330f
Insig. *Véase* proteína génica inducida por insulina
INSR. *Véase* receptor de insulina
insulina, **904**
descubrimiento de, 900, 901r
diabetes mellitus producida por defectos en, 930-931
elevado nivel de glucosa sanguínea y, 923, 923t, 924f
en la regulación de la masa corporal, 934
en la regulación del colesterol, 840-841, 841f, 842f
en la regulación global del metabolismo glucídico, 923, 923t, 924f
interacciones con la adrenalina, 464, 464f, 465f
mediación por GSK3 de, 608-609, 609f
mitocondrias defectuosas que impiden la liberación de, 745-746, 746f
regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis por, 594-598, 594f, 595t, 596f, 597r
regulación de la síntesis de triacilgliceroles por, 822, 822f
regulación de los hábitos alimentarios por, 909, 909f, 910t
regulación del metabolismo energético por, 909, 909f, 910t
respuesta de GLUT4 a, 410, 411r
secreción por células β pancreáticas de, 923-925, 924f, 925f, 926f
secuencia de aminoácidos de, 97, 97f, 98f
sensibilidad a, efectos de la adiponectina sobre, 935, 935f, 936f
síntesis de, 904, 904f, 905f
integración, **439**
en la señalización por GPCR, 450
en la señalización neuronal, 472
en la transducción de señal, 438f, 439
integrinas, 267, 267f, **405**
Interacciones complementarias proteína-ligando, en el sistema inmune
células y proteínas de la respuesta inmune, 174-176, 175t
métodos analíticos basados en, 178, 179f
unión de anticuerpos a antígenos, 176-178, 175f, 176f, 177f 179f
interacciones de van der Waals, **53**
en agua, 53-54, 53t, 54t
estabilidad proteica y, 117
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-260, 258f, 259f, 260f
interacciones débiles
en complejo enzima-sustrato,
energía de fijación a partir de, 196
especificidad a partir de, 197-199, 198f
optimización del estado de transición de, 196-197, 195f, 196f, 197f
en la especificidad de la transducción de señales, 437
en soluciones acuosas,
aumentos de entropía, 51, 51f
compuestos apolares, 51-54, 52f, 53f, 54t
enlaces de hidrógeno, 47-50, 48f, 48t, 49f, 50f
estructura y función macromolecular y, 54-55, 54t, 55f, 56f
gases apolares, 51, 51t
interacciones de van der Waals, 53-54, 53t, 54t
propiedades coligativas y, 55-58, 56f
solutos cargados, 50, 50t, 51f, 54, 54t
solutos polares, 49-50, 49t, 50f, 54, 54t
estabilidad proteica y, 116-118
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-259, 258f, 259f, 260f
interacciones electrostáticas,
de solutos cargados, 50-51, 50t, 51f, 54, 54t
en la unión a proteínas de membrana, 395-396
estabilidad proteica y, 116-118
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-259, 258f, 259f, 260f
interacciones hidrofóbicas, **52**, 52f, 54, 54t, **389**
interacciones iónicas,
de solutos cargados, 50-51, 50t, 51f, 54, 54t
en la unión de proteínas de membrana, 395-397
estabilidad proteica y, 116-118
plegamiento de homopolisacáridos y, 258-260, 258f, 259f, 260f
interacciones proteína-ligando
complementarias,
células de la respuesta inmune y proteínas, 174-176, 175t
procedimientos analíticos basados en, 178, 179f
unión de anticuerpos a antígenos, 175f, 176-178, 176f, 177f, 179f
encaje inducido y, 157
moduladas por energía química,
miosina y actina, 179-180, 180f
organización de filamentos delgados y gruesos, 179-182, 181f
principios de, 157-158
cooperativas, 165-170, 166f, 167f, 170f
descripción cuantitativa de, 160-162, 160f, 161t, 166-167, 167f
estructura de subunidades de la hemoglobina, 163-164, 163f, 164f
familia globina de proteínas fijadoras de oxígeno, 159
fijación de monóxido de carbono por la hemoglobina, 168r-169r
fijación de oxígeno por la hemoglobina, 164-166, 165f, 166f, 167f, 171-172, 171f, 172f
fijación de oxígeno por la mioglobina, 159, 159f
hemoglobina en la anemia falciforme, 172-173, 172f, 173f
influencia de la estructura proteica sobre, 162-163, 162f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
regulación de, 171-172, 171f, 172f
transporte de dióxido de carbono por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de iones hidrógeno por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de oxígeno por la hemoglobina, 163
unión del hemo al oxígeno, 158-159, 158f, 159f
representación gráfica de, 160, 160f sitios de, 167-168
interacciones receptor-ligando,
balsas de membrana implicadas en, 467, 468
de canales iónicos de compuerta, 439, 440f
como destino de toxinas, 472
neurotransmisores que interaccionan con, 472
potenciales de acción neuronal producidos por, 471, 472f
señalización eléctrica por, 470-471, 471f
de receptores nucleares, 439, 440f
en la regulación del ciclo celular, 759
apoptosis, 484-486, 486f
fosforilación de proteínas n, 479-480, 479f

COPYSTATION

genes supresores tumorales en, 481-484, 485f
niveles oscilantes de CDK en, 476-479, 476f, 477f, 478f, 479f
oncogenes en, 480, 481, 481f, 482r-483r
en microorganismos y plantas, 474-475, 475f
especificidad de, 437, 438f
GPCR. *Véase* receptores acoplados a proteína G
guanilil ciclasa, 465-466, 465f
hormonal. *Véase* hormonas
para hormonas, 902-903, 903f
proteínas adaptadoras multivalentes implicadas en, 467-469, 467f, 468f, 469f
regulación de la transcripción por, 473-474, 473f
RTK. *Véase* tirosina quinasas de receptor
sensibilidad de, 437-438, 438f
tipos de receptores implicados en, 439, 440f
tipos de señales implicadas en, 439, 439t
intercambiador cloruro-bicarbonato
anclado a la membrana de, **400**-401, 401f
cotransporte electroneutro de aniones por, 410-412, 412f
intercambiadores aniónicos, **89**
intercambiador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
intercambiadores de cationes, **89**
intercambio electroneutro, **412**
por el intercambiador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
intercomunicación, entre sistemas de señalización, 464, 465f
interleuquinas, 175
intermediarios, reacción, 193, 193f
intermedio de Holliday resolvasas, 1013f
intermedio de Holliday, **1009**
en la meiosis, 1012, 1013f, 1015
en recombinación específica de sitio, 1017, 1017f
en recombinación genética homóloga, 1009-1010, 1011f
resolución de, 1017-1018, 1018f
intermedios de reacción, **193**, 193f
interruptor I, **443**
de las proteínas G, 442r-444r
interruptor II, **443**
de las proteínas G, 442r-444r
intestino delgado, absorción de grasas por, 648-649, 648f, 649f
intestino, absorción de grasas por, 648-649, 648f, 649f
intolerancia a la lactosa, **550**
intrones de auto-corte y empalme, 1042
estructura secundaria de, 1052, 1054f
propiedades enzimáticas de, 1052, 1054f
intrones espliceosómicos, **1042**
mecanismos de, 1043, 1044f
necesidades, 1043
intrones, 296f, **845**, **956**, 956f
autocorte y empalme, 1041-1042
clases de, 1041
corte y empalme de, 1041-1043, 1042f, 1043f, 1044f
en bacterias, 1041
en cloroplastos, 1041
en el genoma humano, 345-346, 346f
en el procesamiento del RNA, 1039
en mitocondrias, 1041
espliceosómicos, 1042
similitudes de retrovirus con, 1057-1058, 1058f, 1060f
transcripción de, 1041
ion calcio (Ca^{2+})
como segundo mensajero, 450-451, 451t, 454f
en la contracción muscular, 183, 183f, 451
localización en espacio y tiempo de, 451-454, 455f, 455t
movimiento por la bomba SERCA de, 414f, 415, 415f
ion cloruro (Cl^-), proteína de transporte CFTR de, 419r-420r
ion magnesio (Mg^{2+})
en el ciclo de Calvin, 777, 776f
en la clorofila, 755, 756f
necesidades de la hexoquinasa respecto, 538
rubisco y, 784, 785f
unión del ATP por, 507-508, 506f
iones hidrógeno, transporte por la hemoglobina de, 170-171, 170f
iones hidronio, **58**, 59f
iones hidruro, transferencias de electrones por, 619
ionización
de péptidos, 86, 86f
del agua, ácidos débiles y bases débiles, agua pura, 58-59, 59f
constantes de disociación ácida y, 61-62, 61f
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de valoración y, 62-63, 62f, 63f
escala de pH y, 60-61, 60f, 60t
ionóforos, **423**
IP3. *Véase* inositol 1,4,5-trisfosfato
IPTG. *Véase* isopropiltiogalactósido
IRE. *Véase* elementos de respuesta al hierro
irinotecan (Campto), 965r
irisina, **909**, 940t, **942**
IRP1. *Véase* proteínas reguladoras del hierro
IRP2. *Véase* proteínas reguladoras del hierro
IRS-1. *Véase* sustrato-1 del receptor de insulina
islotes de Langerghans, 923, 924f, 925f
isocitrato deshidrogenasa, **625**
en el ciclo del ácido cítrico, 623, 625-626, 628f
fosforilación de, 232
mutaciones en, 639-640, 639f
regulación de, 638, 638f
isocitrato liasa, **795**
isocitrato, **625**
formación en el ciclo del ácido cítrico de, 623f, 625, 626r-627r, 627f
oxidación en el ciclo del ácido cítrico de, 623f, 625-626, 628f
isoleucina, 79, 79s, 694, **698**, **869**
biosíntesis de, **868**-870, 868f-869f
catabolismo de, 688-689, 688f, 694-695, 695f, 696f, 698-702, 699f, 701f, 702r-703r
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
isomerasas, 191t, **550**
isómeros cis-trans, **16**, 17f
isómeros geométricos, **16**, 17f
isómeros, 16-19, 17f, 18f, 18r
isopentenil pirofosfato, 845
Δ^3-isopentenil pirofosfato, **832**
en la síntesis de colesterol 831f, 832, 832f
isoprenilación, postraducción, 1102, 1102f
isopreno, **830**
como precursor de una gran cantidad de biomoléculas, 845-847, 847f
en la síntesis de colesterol 830-833, 831f, 832f, 833f, 834f
isopreniltransferasas (PTases), 1102, 1102f
isoproterenol, 441s
isozimas, **536**, **588**
hexoquinasa, 588-589, 588r, 589f
LDH, 588r
ivacaftor, para FC, 420r

J

J. Véase flujo
Jacob, François, 293, 1123
Jagendorf, André, 770
Januvia. *Véase* sitagliptin
jasmonato, 375, 820
Jencks, William P., 197
Jun, en la regulación del ciclo celular, 478, 479

K

k. Véase constante de Boltzmann
K'_{eq}. *Véase* constante de equilibrio estándar
K_a. *Véase* constantes de disociación ácida; constante de asociación
k_{cat}, **205**, 205t
comparaciones de enzimas mediante, 205-206, 205t
K_d. *Véase* constante de disociación
Kendrew, John, 131, 134r, 141, 142
Kennedy, Eugene, 622, 708, 825
K_{eq}. *Véase* constante de equilibrio
Khorana, H. Gobind, 1072
Kilby, B. A., 217
Km. Véase constante de Michaelis
Köhler, Georges, 178
Kornberg, Arthur, 606r, 983, 1038
Koshland, Daniel, 169, 198
KR. Véase β-cetoacil-ACP reductasa
Krebs, Hans, 617, 682
KS. *Véase* β-cetoacil-ACP sintasa
KSR, 468, 470f
K_t ($K_{transporte}$), **408**
para la glucosa, 408-409, 408f
Kühne, Frederick, W., 190

L

L-fluoroalanina, **879**
L-glutamato deshidrogenasa, **678**
desaminación oxidativa del glutamato por, 678-680, 680f
L-malato deshidrogenasa, 623f, 631
β-lactamasas, **226**, 226-227, 227f
lactasa, 252,550
lactato deshidrogenasa (LDH), **552**
isozimas de, 588
lactato, **552**, 940
reducción de piruvato a, 552-553, 554r
síntesis de glucosa a partir de, 558, 559f, 561, 561f
Lactobacillus bulgaricus, 555
lactonas, 249, 249f
lactonasa, **565**
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 564f
lactosa permeasa, **419**, 421f, 421
lactosa, 252-253, 253f
metabolismo por *E. coli* de, regulación de, 1123-1125, 1123f, 1124f, 1130-1131, 1131f
laderanos, 857r
lamelas, **753**
lamina, **479**
fosforilación por CDK de, 479
lanosterol, **833**, 835f
lanzadera de carnitina, **650**, 651- 652, 651f, 652f, 659
lanzadera del glicerol3-fosfato, **735**, 736f
lanzadera del malato-aspartato, **684**, 685f, **735**, 736f
Lardy, Henry, 725
Lavoisier, Antoine, 495
lazos T, **1059**
en telómeros, 1059, 1061f
LCAT. *Véase* lecitina-colesterol acil transferasa
LDL. *Véase* lipoproteína de baja densidad
lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT), **840**, 841f
lectinas, **270**, 271-272, 271f, 272f
interacciones de glúcidos con, 273-274, 273f, 274f
lectura del, desplazamiento del marco de lectura de traducción
y edición del RNA en, 1077-1079, 1077f, 1078f, 1079f
leghemoglobina, **859**
Lehninger, Albert, 622, 708
Leloir, Luis, 600
lengua negra, 524,525f
leptina, **909**, 909f, 910t, **932**, 932f
estimulación de la hormona peptídica anorexigénica por, 933, 933f
expresión gérica desencadenada por, 933-934, 934f
leucemia
inhibidores de la asparragina en, 867-868
inhibidores de la proteína quinasa en, 482r-483r
leucemia linfoblástica aguda (ALL), 867-869
leucemia mieloide aguda, 482r
leucemia mieloide crónica, 484r
leucina, **79**, 79s, **694**, **870**
biosíntesis de, 868f-869f, 868-870
catabolismo de, 688f, 688-689, 694-695, 695f, 696f, 700-702, 699f
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
leucocitos, **174**, **921**, 921f
papel de la lectina en el desplazamiento de, 270-271, 271f
tipos de, 175t
leucotrienos (LT), 373f, **874**, **819**, 904
síntesis de, 819, 819f
levadura
complejo PDH de, 620, 620f
expresión de proteínas recombinantes en, 328-329
fermentación a etanol por, 553, 553f, 556r
regulación del metabolismo de la galactosa en, 1145, 1146f, 1147f
replicadores de, 994
síntesis de fosfolípidos en, 825-827, 828f
UAS en, 1142, 1143f
levadura de panificación, fermentación del etanol por, 553, 553f
Lewis, Edward, B., 1152
ley de Lambert-Beer, 80r
LHC. *Véase* complejos de captación de la luz
LHCII, 756-757, 758f
absorción de excitones por, 768
transición de estados y, 766-768, 768f
LHON. *Véase* neuropatía óptica hereditaria de Leber
liasas, 191t, **629r**
ligandos, **157**, 158
interacciones de proteína con. *Véase* interacciones proteína-ligando

interacciones de receptor con. *Véase* interacciones receptor-ligando
ligasas, 191t, 629r
lignúrias, 257, **880**
limoneno, 375
Lind, James, 128r
línea M, 182, 181f, 183
linfocitos B, **175**, 175t, 177
linfocitos T, **175**, 175t
linfocitos, **174**, **921**, 921f
recombinación en, 1021
linoleato
β-oxidación de, 657-658, 658f
síntesis de, 814-815, 814f, 815f, 818
α-linoleato, 814-85, 814f, 815f, 818
α-linolenato, 820
lipasas, **862**
análisis de glúcidos mediante, **274**
lipidoma, **16**, **382**
lipidómica, 382, 382t
lípidos anulares, **894**, 894f
lípidos de almacenamiento, ácidos grasos como, 364f-365f
ceras, 363-364, 364f
como derivados hidrocarbonados, 359-362, 360t, 361f
triacilgliceroles, 362-363, 362f, 363f
lípidos de membrana, 364, 364f-365f
característicos, 388, 388t, 389f
desplazamiento transbicapa de, 398-399, 399f
difusión a saltos de, 400, 400f
difusión lateral de, 398-401, 399f, 400f, 401f
esfingolípidos,
acumulaciones anormales de, 371r
balsas de, 401-402, 401f, 402f
como derivados de esfingosina, 368, 369f
como sitios de reconocimiento biológico, 369-370, 370f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
desplazamiento transbicapa,399, 399f
estados ordenados de, 397-398, 398f, 398t
esteroles, 370-372, 370f
balsas de, 401-402, 401f, 402f desplazamiento transbicapa de, 399
luidez de la bicapa lipídica y, 398
galactolípidos y sulfolípidos, 367, 367f
como derivados del ácido fosfatídico, 365-367, 365f, 366f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
lípidos de membrana de arqueas, 369-370, 370f
síntesis de,
CDP-diacilglicerol en, 825-827, 826f, 827f
esfingolípidos, 828, 831f
plasmalógeno, 827-828, 830f
precursores de, 820-821, 821f
rutas eucarióticas a la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, 827-828, 828f, 829f
unión de los grupos de cabeza de fosfolípidos, 824-825, 825f
transporte a las membranas celulares después de, 829
lípidos estructurales, 364, 364f-365f
esfingolípidos como,
acumulación anormal de, 371r
como derivados de esfingosina, 368, 369f
como sitios de reconocimiento biológico, 369-370, 370f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
esteroles, 370-372, 370f
galactolípidos y sulfolípidos, 367, 367f
glicerofosfolípidos,
ácidos grasos con enlace éter en, 366-367, 367f
como derivados del ácido fosfatídico, 366-366, 366f, 366f
degradación lisosomal de, 370, 370f, 371r
lípidos de membrana en arqueas, 367-368, 368f
lípidos éter, **366**, 367f
síntesis de, 827-828, 830f
lípidos, 10f, **16**
ácidos grasos. *Véase* ácidos grasos
activación de, 650-652, 651f, 652f
almacenamiento. *Véase* lípidos de almacenamiento
análisis de, 379-380, 380f
categorización, 382, 382t
extracción, 380, 380f
identificación, 380f, 382, 381f
separación, 380- 381, 380f
clasificación de, 382, 382t
como cofactores
dolicoles, 377f, 378
quinonas lipídicas, 377f, 377-378
vitaminas E y K, 377-378, 377f
como metabolitos secundar
ios metabólicamente activos,379, 379f
como pigmentos, 379, 378f
como señales,
compuestos volátiles de planta vasculares, 375
fosfatidil inositoles y derivados de la esfingosina, 372-373
hormonas esteroides, 372, 374, 374f
icosanoides, 373-374, 373f
vitaminas A y D, 375-377, 375f, 376f, 377f
digestión de, 648-649, 648f, 649f
en membranas. *Véase* lípidos de membrana
estructurales, 364, 364f, 365f
esfingolípidos como, 368-370, 369f, 370f, 371r
esteroles, 370-372, 370f
galactolípidos y sulfolípidos, 367, 367f
glicerofosfolípidos, 365-366, 365f, 366f, 367f, 370, 370f, 371r
lípidos de membrana en arqueas, 367-368, 368f
movilización de, 649-650, 650f, 651f
oxidación de. *Véase* oxidación de ácidos grasos
transporte de, 650-652, 651f, 652f
lipoato, **619**, 620s
en el complejo PDH, 619, 619f, 620f
lipopolisacáridos, 268-269, **269**, 269f
lipoproteína de alta densidad (HDL), **839**
efectos de los ácidos grasos trans sobre, 363, 363f
en aterosclerosis, 843-844, 843f, 845r-846r
ransporte de colesterol como, 836f, 837t, 839, 839f, 841f, 844, 844f
lipoproteína de baja densidad (LDL), **837-838**
captación celular de, 838-839, 840f
efectos de los ácidos grasos trans sobre, 363, 363f
en la aterosclerosis, 843-844, 843f, 845fb-846r
transporte de colesterol en, 836f, 837t, 838, 839f
lipoproteína lipasa, 648f, **649**
lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), 649, **838**
transporte del colesterol como, 836f, 837t, 838-838
lipoproteínas plasmáticas, **836**
transporte de colesterol como, 836-838, 836f, 837f, 838f, 839f
lipoproteínas, **88**, **649**. *Véase* también lipoproteínas plasmáticas
liposoma, 390, 390f
lipoxinas (LX), 373f, **374**, 820, 904
lisina, 79s, **81**, **694**, **869**
biosíntesis de, 868f-869f, 868-870
catabolismo de, 688f, 687-688, 694, 695f, 696f
en catálisis ácido-base general, 199f
en proteínas de membrana, 395
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
rubisco y, 777, 779f
lisofosfolipasa, 370
lisosomas, **7**, 8f
degradación de fosfolípidos y esfingolípidos por, 370, 370f, 371r
direccionamiento de proteínas hacia, 1108-1109, 1108f
lisozima, 260
mecanismo de, 223-225, 223f, 224f
LKB1, 580
lncRNA. *Véase* RNA largos, no-codificantes
localización de respuesta, **439**
en la transducción de señales, 438f, 439
locus HAR1F, 350f
Loeb, Jacques, 534
logo de secuencias, 105r
lomidamina, en el tratamiento del cáncer, 546r-547r
lopinavir, 221f
lovastatina (Mevacor), 379f, 645r-846r
LT. *Véase* leucotrienos
luciérnaga, producción de luz por, 515r
luciferasa, 76f, 515r
luciferina, 515r
luteína
absorción de la luz por, 755
estructura de, 756f
luz
absorción de, 752, 752f
por clorofilas, 756, 756f, 757f
por cloroplastos, 752-755, 753f, 754f, 755f
por pigmentos accesorios, 755, 757f
transferencia de excitones en, 756-757, 758f, 759f
detección de, señalización GPCR en, 456-458, 456f 457f, 458f,458r
producción por la luciérnaga de, 515r
visible, 754, 755f
luz ultravioleta
absorción por aminoácidos de, 80, 80f, 80r
absorción por nucleótidos de, 286, 286f, 295-297
daño al DNA causado por, 299-300, 299f
luz visible, 754, 754f
LX. *Véase* lipoxina
LXR. *Véase* receptor X hepático
Lynen, Feodor, 833

M

MacKinnon, Roderick, 426
MacLeod, J. J. R., 901r
macrocitos, **691**
macrófagos, **174**, 175t
fagocitosis de anticuerpos unidos por, 177, 176f
macromoléculas con información, **16**
energía del ATP para el ensamblaje de, 514
macromoléculas, **15**
celulares, 9-10, 10f, 11f, 15-16, 15t
en agua, estructura y función y, 54-55, 54t, 55f, 56f
malaria,
deficiencia de G6PD y 566r
hemoglobina S y, 173
malato deshidrogenasa, **560**
en la gluconeogénesis, 560-561, 561f
en la ruta C_4, 791f, 791
malato sintasa, 795
malato, **631**
a partir del ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f, 684
en la gluconeogénesis, 560-561, 561f
hidratación de fumarato a, 623f, 631
oxidación de, 623f, 631
reacciones anapleróticas que proporcionan, 634-635, 635f, 635t
MALDI MS. *Véase* espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz
malformaciones congénitas, la deficiencia de vitamina A causa, 376-377
malonato, inhibición de la succinato deshidrogenasa por, 631
malonil-CoA, **659**, **805**, 805s
en la regulación de la oxidación de ácidos grasos, 659, 659f, 662
en la síntesis de ácidos grasos
formación de, 805-806, 806f
secuencia de reacciones repetitivas con utilización de, 806, 807f, 88, 808f, 809f, 810-811, 810f
en rutas alimentadoras de la glucólisis, 549
malonilVacetil-CoA-ACP transferasa (MAT), **808**, 809f
maltosa, 252
maltotriosa, en rutas alimentadoras de la glucólisis, 549
manosa 6-fosfato, interacciones de lectinas con, 273, 273f
manosa, 245, 246f, 246s
manosa, en rutas alimentadoras de la glucólisis, 549f, 552
manosamina, 249, 249f
MAP quinasa quinasa quinasas (MAPKKK), 462-463
MAP quinasa quinasas (MAPKK), 462-463
mapa genético de Escherichia coli, 979, 980f
mapa genómico de Escherichia coli, 979-980, 980f
mapeado
desnaturalización, 982
genético, de *Escherichia coli*, 979-980, 980f
MAPKK. *Véase* MAP quinasa quinasas
MAPKKK. *Véase* MAP quinasa quinasa quinasas,
marcador de cribado, **325**, 326, 326f
marcador seleccionable, **325**, 325f, 326-327, 326f, 327f
MARCKS, unión a membrana de, 395-396
marco de lectura abierto (ORF), **1073**
marco de lectura, **1070**, 1071f
ajuste de, 1073
desplazamientos en, 1077-1079, 1077, 1078, 1079f
maresinas, 820
Margulis, Lynn, 36-37
masa molecular, 13r
mastocitos, en la respuesta alérgica, 177-178
MAT. *Véase* malonilVacetil-CoA-ACP transferasa
materia, transformación de, por organismos vivos, 21, 24f

maternos, 1152, 1163, 1154f, 1155f
matriz extracelular (ECM), **260**
glucosaminoglucanos en, 260-262, 261f
proteoglucanos en, 263-267, 263f, 264f, 265f, 267f
Matthaei, Heinrich, 1071
MCAD. *Véase* acil-CoA de cadena media deshidrogenasas
McClintock, Barbara, 1005-1006
McElroy, William, 516r
MDR1. *Véase* transportador multifármaco
ME. *Véase* microscopía electrónica
mecanismo de doble desplazamiento, 206-208, 207f
mecanismo Ping-Pong, 207-208, 207f
meclofenamato, inhibición de la síntesis de prostaglandinas por, 373-374, 373f
mediadores pro-resolución especializados, **819**
medias reacciones, 517-518
potenciales de reducción estándar de, 521t
Mediator, **1144**, 145f
medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID), inhibición de la síntesis de prostaglandinas por, 373-374, 373f, 819
medicamentos antitumorales, resistencia tumoral a, 418
medicamentos esteroides, 374, 376f
medicamentos quimioterápicos
dianas basadas en la glucólisis de, 546r-547r
dianas en la biosíntesis de nucleótidos de, 894-895, 893f, 894f, 895f
inhibidores de proteína quinasas, 482r-484r
inhibidores de topoisomerasas como, 964r-965r
resistencia tumoral a, 418
medicamentos sulfonilurea, **924**, 925, 943, 943t
medicina forense, uso de la PCR en, 301, 306r-307r
medicina genómica personalizada, 344r
medición eléctrica, de la función de los canales iónicos, 426, 425f
medidas de HbA1c, 250r-251r
medio acuoso, organismos vivos en, 69
megaloblastos, **691**
meiosis, **1011**
entrecruzamiento en, 1011-1012, 1013f, 1014r, 1015f
fetal, errores en, 1014r
proceso de, 1011, 1012f
recombinación genética homóloga durante, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1015f
rotura de doble cadena como inicio de, 1012-1016
MEK, en señalización INSR, 462-463, 462f
Mello, Craig, 1150
membranas
balsas en,
esfingolípidos y colesterol en, 401-402, 401f, 402f
segregación de proteínas señalizadoras por, 466, 468-469
composición y arquitectura de
bicapa lipídica, 389-391, 389f, 390f391f
lípidos y proteínas característicos, 388, 388t, 389f
propiedades fundamentales, 389, 389f
proteínas anfitrópicas, 392, 392f, 397
proteínas integrales de membrana, 391-395, 392f, 393f, 394f, 395f, 396f
proteínas periféricas de membrana, 392, 392f, 396-397, 396f
de cloroplastos, 752-753, 753f
de las mitocondrias, 708, 709f
dinámica de
adhesión a la superficie, señalización y otros procesos de las proteínas integrales, 405
agrupamientos de esfingolípidos y colesterol en balsas, 401-402, 401f, 402f
catálisis de los desplazamientos de lípidos transbicapa, 398-399, 399f
difusión lateral de lípidos y proteínas en la bicapa, 399-401- 400f, 401f
ordenamiento de los grupos acilo en la bicapa,397-398, 398f, 398t
procesos de curvatura y fusión de membranas, 403-405, 403f, 404f
funciones de, 387, 387f
transporte de solutos a través de,
en la regulación metabólica, 576, 576f
estructuras y mecanismos de transportadores y canales iónicos, 406-408, 407f
impulsados por gradiente iónico, 418-423, 418t, 421f, 422f
por acuaporinas, 423-425, 423t, 424f
por ATPasas tipo-P, 413-416, 414f, 415f
por ATPasas tipo-V y tipo-F, 416, 416f
por canales de compuerta, 427-430
por canales de K^+, 426-427, 427f, 428f
por canales iónicos 419r-420r, 425-431, 425f, 427f, 428f, 429t, 430t
por cotransporte, 410-412, 42f, 418-423, 418t, 421f, 422f
por el intercambiador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412
por GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
por transportadores ABC, 417-418, 417f, 418f, 419r,-420r
por transporte activo secundario 418-423, 418t, 421f, 422f
por transporte activo. *Véase* transporte activo
por transporte pasivo. *Véase* transporte pasivo
tipos de, 405-406, 406f
membranas de los tilacoides,
galactolípidos en, 367, 367f
localización de PDI y PSII en, 765-766, 767f, 768f
transporte inducido por la luz a través de, 783-785, 784f, 785f
membranas mitocondriales, composición de, 388, 389f
membranas plasmáticas, **3**, 3f
balsas en,
esfingolípidos y colesterol en, 401-402, 401f, 402f
señalización de la segregación de proteínas por, 469
capa de glúcidos sobre, 263 composición y arquitectura de,
bicapa lipídica, 389-391, 389f, 390f, 391f
lípidos característicos y proteínas, 388, 388t, 389f
propiedades fundamentales, 389, 389f
proteínas anfitrópicas, 392, 392f, 397
proteínas integrales de membrana, 391-395, 392f, 393f, 395f, 396f
proteínas periféricas de membrana, 392, 392f, 396-397, 396f
desplazamiento de agua a través, 56-57, 56f
difusión de,
adhesión a la superficie, señalización y otros procesos de proteínas integrales, 405
agrupamiento de esfingolípidos y colesterol en balsas, 401-402, 401f, 402f
catálisis de desplazamientos de lípidos transmembrana, 398-399, 399f
curvatura de la membrana y procesos de fusión, 403-405, 403f, 404f
difusión lateral de lípidos y proteínas en la bicapa, 399-401, 400f, 401f
ordenamiento de grupos acilo en la bicapa, 397-398, 398f, 398t
funciones de, 387, 387f
glucoforina en, 392-393, 393f
glucolípidos en, 268-269, 269f
glucoproteínas en, 268
lectinas en, 270-272, 271f, 272f
lípidos en. *Véase* lípidos de membrana
lipopolisacáridos en, 268-269, 271f
modelo del mosaico fluido, 389, 389f
proteínas en. *Véase* proteínas de membrana
proteoglucanos en, 263-267, 263f, 264f, 267f
transporte de solutos a través
en la regulación metabólica, 576, 576f
estructuras y mecanismos de transportadores y canales iónicos para, 406-408, 407f
impulsados por gradientes iónicos, 418-423, 418t, 421f, 422f
por acuaporinas, 423-425, 423t, 424f
por ATPasas tipo P, 414-416, 414f, 415f
por ATPasas tipo-V y tipo-F, 416-417, 416f
por canales de compuerta, 427-430
por canales de K^+, 426-427, 427f, 428f
por canales iónicos, 419r-420r, 425-430, 425f, 427f, 428f, 429t, 430t
por cotransporte, 410-412, 412f, 418-423, 418t, 421f, 422f
por el intercambiador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
por GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
por transportadores ABC, 417-418, 417f, 418t, 419r-420r
por transporte activo secundario, 418-423, 418t, 421f, 422f
por transporte activo. *Véase* transporte activo
por transporte pasivo. *Véase* transporte pasivo
tipos de, 405-406, 406f
Menten, Maud, 201-202
mentol, 375
MERRF. *Véase* síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas,
Merrifield, R. Bruce, 102-103
Meselson, Matthew, 981
Met-tRNA sintetasa, 1098
metabolismo C_4, **789**
metabolismo de glúcidos, 574
análisis de control metabólico de, 585-586, 586f
coordinación de glucogenólisis y glucogénesis en
fosforilación y desfosforilación de la glucógeno sintasa, 607-608, 609f
la regulación alostérica y hormonal de la glucógeno fosforilasa, 604-607, 605f
mediación por GSK3 de la insulina, 608-609, 609f
papel del PPI en, 609, 610f
señales alostéricas y hormonales en el metabolismo glucídico global, 609-611, 610f, 611f
coordinación de la glucólisis y la gluconeogénesis en, 587, 587f
ATP en la inhibición alostérica de la piruvato quinasa, 592-593, 593f
conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato, 593-594, 594f
fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación alostérica de PFK -1 y FBPasa-1, 591-592, 591f, 592f
regulación recíproca de fosfofructoquinasa I y fructosa 1,6-bisfosfatasa 590-591, 590f
regulación transcripcional de la hexoquinasa y la glucosa 6-fosfatasa 589-590
regulación transcripcional del número de moléculas de enzima, 594-598, 595t, 594f, 596f, 597r
respuesta de los isozimas de la hexoquinasa a la glucosa 6-fosfato, 588-589, 588r, 589f
xilulosa 5-fosfato como regulador clave en, 592, 593f
en el hígado, 911-913, 913f
equilibrios de reacción y, 578-580, 579f, 579t
integración del metabolismo lipídico con, 611
mantenimiento del estado estacionario en células y
nucleótidos de adenina en, 580-581, 580f, 581f, 581t
organismos, 575
regulación enzimática en, 575-578, 576f, 576t, 577f, 578f, 578t
regulación global de, 609-611, 610f, 611f
xilulosa 5-fosfato como regulador clave de, 592, 593f
metabolismo del DNA. *Véase* también recombinación del DNA; reparación del DNA; replicación del DNA
nomenclatura del, 980-981
visión general, 979-981, 980f
metabolismo del nitrógeno, 853
asimilación de amoníaco en ácido glutámico y glutamina, 860-861
biosíntesis de aminoácidos. *Véase* biosíntesis de aminoácidos
biosíntesis de nucleótidos. *Véase* biosíntesis de nucleótidos
catabolismo de aminoácidos. *Véase* catabolismo de aminoácidos
catabolismo de nucleótidos
ácido úrico producido por, 891-893, 892f, 893f
rutas de recuperación, 892
urea producida por, 891-892, 892f, 893f
ciclo del nitrógeno y, 492, 492f
nitrógeno biológicamente asequible en, 854-855, 854f, 855f, 856r-857r
derivados de aminoácidos
aminas biológicas, 880, 881f
creatina y glutatión, 878-879, 879f
NO, 882-882, 882f
porfirinas, 875-878, 876f, 877f, 878r
sustancias vegetales, 880, 880f
fijación del nitrógeno, 854-860, 854f, 858f, 859ff, 860f
glutamina sintetasa en la regulación de, 861-862, 861f, 861f
metabolismo del RNA, síntesis dependiente de RNA. *Véase* síntesis dependiente de RNA
metabolismo energético, regulación hormonal del, 922

diabetes mellitus y, 930-931
durante el ayuno y en la inanición, 927-929, 927t, 928f, 929f
efectos de la adrenalina en, 929, 929t
efectos de la insulina en, 923, 923t, 924f
efectos del cortisol en, 930
efectos del glucagón en, 925-926, 927f, 927t
secreción de insulina de las células β pancreáticas en, 923-925, 924f, 926f
metabolismo intermediario, **492**
metabolismo lipídico
biosíntesis. *Véase* biosíntesis de lípidos
digestión de grasas, 648-649, 648f, 649f
en el hígado, 914, 914f
formación de cuerpos cetónicos, 666-668, 667f, 668f
integración del metabolismo glucídico con, 611
localización subcelular de, 811, 811f
movilización de grasas, 649-650, 650f, 651f
oxidación. *Véase* oxidación de ácidos grasos
transporte de grasas, 650-652, 651f, 652f
xilulosa 5-fosfato como regulador clave de, 592, 594, 593f
metabolismo, **29**, **492**
como red multidimensional de rutas, 573, 574f
de autótrofos y heterótrofos, 491-492, 492f
específica de tejido, 910, 911f
cerebro, 920-921, 920f
hígado, 910-914, 912t
músculo, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
regulación de. *Véase* regulación metabólica
rutas de, 28-29, 492-494, 493f. *Véase también* rutas específicas
coordinación por AMPK de, 935-936, 935f, 936f, 937f
flujo a través de. *Véase* flujo
paso limitante de velocidad en, 582
red multidimensional de, 573, 574f
metabolitos secundarios, **14**, **379**
lípidos biológicamente activos, 379, 379f
metabolitos, **3**, **492**
transporte por la sangre de, 921-922, 921f, 922f
celulares comunes, 14, 15
metaboloma, **14**, **577**, 577f
metabolómica, **14**
metabolones, 639
en el ciclo de la urea, 682
metaloproteínas, **89**
metamerismo, **1152**
metano, oxidación del, 622-624
metanógenos, 856r, 1090r-1092r
metanol
envenenamiento por, 210
extracción de lípidos mediante, 380, 380f
metformin (Glucophage), 943, 943t
metil-lisina, 1102f
metilación, 230, 231f
análisis de glúcidos mediante, 274-275
de guanina, 300
de histonas, 1140-1141, 1141t
de RNA de transferencia, 1050, 1050
de RNA mensajeros, 1049, 1049f
del DNA, 300
en reparación de apareamientos incorrectos, 998-999- 998f, 999f
metilglioxal, **692**
metilglutamato, 1102f
metilmalonil-CoA epimerasa, 658f, **659**
metilmalonil-CoA mutasa, 658f, **659**
5'-desoxiadenosilcobalamina como cofactor de, 658f, 658, 660r-661r
metilmalonil-CoA, **658**, 658f, 659
metionina adenosil transferasa, **689**, 691f
metionina sintasa, 689-691, 691f
metionina, **79** 79s, 689-690, 691f, **698**, **869**
biosíntesis de, 868f-869f, 868-570
catabolismo de, 688f, 698-700, 699f, 700r-701r
inicio de la síntesis de proteínas por, 1089, 1088f, 1089f, 1089-1095, 1093f, 1094f, 1096f, 1096t
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
método de la fosforamidita, síntesis de DNA mediante 301, 302f
metotrexato, **894**, 894f, 895
Mevacor. *Véase* lovastatina
mevalonato, **832**
en la síntesis de colesterol, 832-833, 832f, 833f
Meyerhoff, Otto, 534
mezcla racémica, **17**
MFP. *Véase* proteína multifuncional
MFS. *Véase* superfamilia facilitadora principal
Mg^{2+}. *Véase* ion magnesio
MGDG. *Véase* monogalactosildiacilgliceroles
micelas, **52**, 52f, **390**, 390f
Michaelis, Leonor, 201-202
microbios intestinales, regulación de la masa corporal por, 940, 940f
microchips de DNA, **340**, 340f, 341, 341f
microchips de oligosacáridos, **276**, 277f
microchips,
de DNA, 340-341, 340f, 341f
de oligosacáridos, 275-276, 277f
microdominios, **401**
colesterol-esfingolípido, 401-402, 401f, 402f
Micronase. *Véase* glyburide
microorganismo, señalización en, 474-475, 475f
microorganismos eucarióticos, señalización en, 474, 475f
microRNA (miRNA), 1051, 1051f
regulación génica por, 1150-1151, 1151f
microscopia de fuerza atómica, 733r
microscopia electrónica (ME), 720r-721r
microtúbulos, 7, 9f, 179
Miescher, Friedrich, 287
mifepristone (RU486), **474**, 474s
migración de rama, **1009**
Milstein, Cesar, 178
mineralocorticoides, **844**, 905
síntesis de, 844-845, 844f, 847f
Minkowski, Oskar, 901r
miocitos, **916**
captación de glucosa por, 410, 411r
miofibrillas, **182**, 181f
mioglobina,
cristalografía de rayos X de, 134r-135r
estructura de, 131-133, 132f, 133f, 134r-136r
efectos de la unión de, 162-163, 162f
función de, 159 hemo en, 158-19, 158f
similitudes con las subunidades de la hemoglobina, 163-164, 163f, 164f
unión de oxígeno por, 159, 159f
cuantificación de, 160f, 162
gráfica de Hill de, 167, 167f
miosina, **190**
corte y empalme alternativo y, 1046f, 1046-1047
estructura de, 182, 182f
fosforilación por CDK de, 479
interacciones de los filamentos delgados de actina con, 183, 182f, 183f
miristilación, 231f
miRNA. *Véase* microRNA
Mitchell, Peter, 707, 724-725
mitocondriales, 741-742, 742t, 743f
mutaciones en, 743-746, 744f, 745f, 746f
origen de, 741-743, 743f
mitocondrias, **7**, 8f
anatomía de, 708, 709f
daño a, 739, 743-746
de plantas, oxidación de NADH en, 723, 724r-725r
desencadenamiento de la apoptosis en, 741, 742f
diabetes mellitus debida a defectos en, 745-746, 746f
en el músculo cardíaco, 919-920, 920f
evolución de, 36-37, 38f, 742-743, 743f
fosforilación oxidativa en. *Véase* fosforilación oxidativa
genes de,
mutaciones en, 743-746, 744f, 745f, 746f
origen de, 741-743, 743f
genoma de, 319, 741-742, 743f
intrones en, 1041
lanzadera de acetato fuera de, 811-812, 813f
lanzadera de NADH al interior de, 684, 685f, 735, 736f
oxidación de acetil-CoA en. *Véase* ciclo del ácido cítrico
oxidación de ácidos grasos en. *Véase* oxidación de ácidos grasos
oxidación de piruvato en, 618-621, 619f, 620f, 621f
producción de calor por, 740, 740f
síntesis de esteroides en, 740-741, 741f
mitofagia, **708**
mixotiazol, 715t
MMA. *Véase* acidemia metilmalónica
modelo concertado, **168**, 170f
modelo de mosaico fluido, **389**, 389f
modelo de reparación por rotura de doble cadena, **1014**, 1013f
modelo del cambio de unión, **751**
para la ATP-sintasa, 729-731, 731f, 732f
modelo MWC, **168**, 170f
modelo secuencial, **169**, 170, 170f
modelos de bolas y palos, 16, 16f
modelos espaciales, 16, 16f
modificación covalente, **228**
de enzimas reguladores, 230-231, 231f
en regulación metabólica, 578, 578f
de histonas, 967, 970r-971r, 1140-1141, 1141t
de HMG-CoA reductasa, 841, 842f
de la acetil-CoA carboxilasa, 812, 813f
de la glutamina sintetasa, 861-862, 862f
del complejo PDH, 637-638, 638f
modificaciones amino-terminales, postraducción, 1100
modificaciones carboxilo terminales, postraducción, 1100
modificaciones de histonas, 967, 970r-971r, 1140-1141, 1141t
modificaciones postraducción, **1100**
de proteínas, 1080f, 1081, 1081t, 1100-1103, 1102f
en el direccionamiento de proteínas, 1105-1106, 1106f, 1107f
Modrich, Paul, 999
moduladores alostéricos, **228**
de enzimas alostéricos, 228-229, 228f, 229f
moduladores, **166**
de enzimas alostéricos, 228-229, 228f, 229f
modularidad, en transducción de señales, 438, 438f
MODY. *Véase* diabetes juvenil de aparición en la madurez
moldes de mRNA artificiales, descifrado del código genético
mediante, 1070-1075, 1071f, 1072t, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
molécula proquirales, **632r**
moléculas antena, **756**
en el fotosistema I, 764f, 765
en el fotosistema II, 10-11, 765
moléculas hidrofílicas, **50**
moléculas hidrofóbicas, **50**
monensina, 423
Monod, Jacques, 168, 293, 1123
monogalactosildiacilgliceroles (MGDG), 367f
monooxigenasas, 816r
P-450, 816r-817r
síntesis de esteroides por, 740-741, 741f, 817r
monosacáridos, **243**
centros asimétricos de, 244-245, 245f, 246f
como agentes reductores, 250, 250r-251r
derivados de hexosas en organismos vivos, 248-250, 249f
dos familias de, 244, 244f
estructuras cíclicas, 245-248, 246f, 247f, 248f
símbolos y abreviaturas, 253t
monóxido de carbono (CO)
funciones reguladoras o de señalización por, 878
interferencia con la fosforilación oxidativa por, 715t
unión por la hemoglobina de, 168r-169r
morfógenos, **1152**
moscas del vinagre, regulación del desarrollo en, 1151- 1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
motivos de reconocimiento de RNA (RRM), **1127**, 1128f
motivos, **137**
clasificación basada en, 140-141, 140f
de proteínas globulares, 133, 133t, 137-138, 137f, 138f
de unión al DNA, 1125-1128, 1125f, 1126f, 1127f, 1128f
motores moleculares. *Véase* proteínas motoras
movimiento
proteínas motor que producen,
interacciones de, 183, 182f, 183f
miosina y actina, 180, 180f
proteínas organizadoras de los filamentos delgado y grueso, 179-183, 181f
proteínas organizadoras de los filamentos delgado y grueso, 182-183, 181f
MPC. *Véase* transportador de piruvato mitocondrial
M_r, 1052
mRFP1, 452r
mRNA maternos, **1152**
mRNA monocistrónico, **293**, 293f
mRNA policistrónico, **293**, 293f
mRNA. *Véase* RNA mensajeros
MS. *Véase* espectrometría de masas
MS/MS. *Véase* MS en tándem
mtDNA. *Véase* DNA mitocondrial

mTORC1, **936**
regulación del crecimientop por, 936, 937*f*
mucinas, **268**
mucopolisacáridos. *Véase* glucosaminoglucanos
mucopolisacaridosis, 266*r*
muerte celular programada, **484**, **741**
multímero, **141**
multiplicidad enzimática, **873**
músculo
músculo cardíaco
captación de glucosa por, 410, 411*r*, 545-548
creatina quinasa en, 919*r*
efectos del NO sobre, 466
funciones metabólicas de, 919-920, 920*f*
músculo de contracción lenta, **917**
músculo de contracción rápida, **917**
músculo esquelético
captación de glucosa por, 410, 411*r*, 545-548
funciones metabólicas de, 916-920, 917*f*, 918*f*, 918*r*-919*r*, 920*f*
isozimas de la hexoquinasa de, 588-589, 588*r*, 589*f*
proteínas motoras en
interacciones de, 182*f*, 183, 183*f*
miosina y actina, 179, 180*f*
proteínas organizadoras de los filamentos delgados y gruesos, 181*f*, 182-183
regulación glucídica en, 609-611, 610*f*, 611*f*
transporte de amoníaco desde, 680, 681*f*
mutación de sustitución, 997
mutación de transición, **1077**
mutación genética, evolución a través de, 32-33, 33*f*
mutación por deleción, 997
mutación por inserción, 997
mutaciones conductoras, **483**
mutaciones silenciosas, **997**, **1077**
mutaciones sin sentido, **1077**
mutaciones, **32**, **298**, **951**, **997**
con unión de extremos no homólgos, 1015-1016, 1016*f*
del VIH, 1057
deleción, 996-997
en genes mitocondriales, 743-746, 744*f*, 745*f*, 746*f*
en genes supresores de tumores, 481-484, 485*f*
en oncogenes, 480, 481, 481*f*, 482*r*-483*r*
en promotores, 1030
en síntesis de DNA translesión propensa al error, 1003-1005, 1006*f*, 1006*t*, 1007*r*-1008*r*
enfermedad debida a. *Véase* enfermedad genética
evolución a través de, 32-33, 33*f*
inserción, 996-997
mecanismo de, 1004*f*
productoras de cáncer, 997, 997*f*, 1007*r*-1008*r*
resistencia del código genético a, 1077
silenciosas, 997
sin sentido, 1100*r*
SNP, 346
en el genoma humano, 344*r*, 346-347, 347*f*
sustitución, 997
transformaciones no enzimáticas, 298-300, 297*f*, 299*f*, 300*f*
mutagénesis dirigida por oligonucleótido, **330**, 331*f*
mutágenesis dirigida, **330**, 331, 331*f*
mutarrotación, **248**
mutasas, **550**

N

N-acetilglucosamina, *en quitina*, 257-258, 258*f*
N-acetilglutamato sintasa, **685**
N-acetilglutamato, **685**
regulación de la carbamil fosfato sintetasa I por, 685, 685*f*
N-acilesfinganina, **828**, 831*f*
N-acilesfingosina, **828**, 831*f*
N-formilmetionina (fMet), 1089, 1093
N^{10}-formiltetrahidrofolato, en biosíntesis de purinas, 883, 884*f*
Na^+K^+ ATPasa, **416**
en la señalización eléctrica, 470-471, 471*f*
energía del ATP para, 514
estructura y mecanismo, 415-416, 414*f*, 415*f*
NAD. *Véase* nicotinamida adenina dinucleótido
NADH deshidrogenasa, 653*f*, **654**, **714**, 713*t*, 714-715, 714*f*, 715*t*
NADH:ubiquinona oxidorreductasa, **714**, 713*t*, 714-715, 714*f*, 715*t*
NADP. *Véase* nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBD. *Véase* dominio de unión de nucleótido
ncRNA. *Véase* RNA no codificantes,
Neandertales, secuenciación del genoma de, 351-353, 352*f*, 353*r*-354*r*
nebulina, **182**
nefrona, acuaporinas en, 423
Neher, Erwin, 426
nelfinavir, 221*f*
Neu5Ac. *Véase* ácido *N*-acetilneuramínico
neuroglobina, función de, 159
neuronas anorexigénicas, **933**, 933*f*
neuronas
canales iónicos de compuerta en, 427-430
dianas de toxinas, 473
potenciales de acción producidos por, 471-473, 472*f*
suministro de energía a, 920-921, 920*f*
neuronas orexigénicas, **933**, 933*f*
neuropatía óptica hereditaria de Leber (LOHN), **744**
neuropéptido Y (NPY), **909**, 910*t*, **933**, 933*f*
neurotransmisores
biosíntesis de, 880-881, 881*f*
en señalización neuronal, 471, 472*f*
neurotransmisores en 471, 472*f*
Nexavar. *Véase* sorafenib
NHEJ. *Véase* unión de extremos no homólogos
niacina (ácido nicotínico), **524**, 525*s*
deficiencia de, 524, 525*f*
nicho, **115**
de células madre, 1157-1160
nicotinamida adenina dinucleótido (NAD, NAD^+, NADH), 312*f*
como sustrato enzimático, 525-524
como transportador electrónico soluble, 522-523, 522*f*, 523*f*
deficiencia de, 524, 525*f*
en el complejo PDH, 619
en gluconeogénesis, conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato, 558-561, 560*f*, 561*f*
en la cadena respiratoria mitocondrial, 708-710, 710*t*, 712*t*
en la ruta glucolítica, 535*f*, 526, 536*f*, 540-544, 542*f*, 543*f*
acoplamiento de, 536-537
lanzadera de glicerol 3-fosfato, 736, 736*f*
lanzadera del malato-aspartato para, 682-684, 685*f*, 735, 736*f*
oxidación en plantas de, **723**, 724*r*-725*r*
regeneración de, por fermentación, 552
nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP, $NADP^+$, NADPH)
como transportador electrónico soluble, 522-523, 522*f*, 523*f*
deficiencia de, 524, 525*f*
en el ciclo de Calvin, 755*f*, 778-779, 780*f*
fuente de, 783-785, 785*f*
necesidades de, 779-781, 783*f*, 784*f*
en la cadena respiratoria mitocondrial, 708-710, 710*t*, 712*t*
en la fotosíntesis, 762
esquema Z, 752
en la ruta de las pentosas fosfato, 564-564, 564*f*, 566*r*
distribución de la glucosa 6-fosfato entre la glucólisis y, 568, 568*f*
en la síntesis de ácidos grasos, 806, 807*f*, 809*f*, 810-812
Nirenberg, Marshall, 1071-1072
nitrato reductasa, **854**, 855*f*
nitrificación, **854**, 854*f*
nitrito reductasa, **854**, 855*f*
nitroglicerina, para la angina de pecho, 466
nitrovasodilatadores, para la angina de pecho,466
NKCC1. *Véase* cotransportador 1 de Na^+-K^+-$2Cl^-$
NLS. *Véase* secuencia de localización nuclear
NO sintasa, **466**, **906**
NO. *Véase* óxido nítrico
nódulos de las raíces, bacterias fijadoras de nitrógeno en, 855, 859-860, 860*f*
Noller, Harry, 1069
nomenclatura de Cleland, **207**, 207*f*
Nomura, Masayasu, 1081-1082
noradrenalina (veáse norepinefrina), **880**, 881*f*, **904**, 929
novobiocina, 964*r*
NPY. *Véase* neuropéptido Y
NSAID. *Véase* medicamentos antiinflamatorios no esteroides
nucleasas, **983**
núcleo arcuato, **933**
acciones de la insulina n, 934
receptores de lectina en, 932, 932*f*
núcleo esteroide
de esteroles, 370, 370*f* síntesis de, 833-834, 835*f*
núcleo, **3**
direccionado de proteínas al, 1109, 1110*f*
nucleófilos, 218*f*, **502**
biológicos, 502, 502*f*
nucleoide, **3**, **975**, 975*f*
nucleopolihedrovirus multicápsida de *Autographa californica* (AcMNPV), expresión de proteína recombinante utilizando, 329
nucleósido difosfato quinasa, **514**, **630**
mecanismo de, 514-516, 516*f*
nucleósido difosfato quinasas, **887**
nucleósido monofosfato quinasas, **887**
nucleósidos monofosfato, síntesis de nucleósidos trifosfato a partir de, 887
nucleósidos trifosfato
como portadores de energía química, 311-312, 311*f*, 312*f*
conversión de nucleósido monofosfato en, 887
nucleósidos, **281**, 283*f*
nucleosomas, **966**
como unidades fundamentales de la cromatina, 966-969, 968*f*, 969*f*, 970*r*-971*r*
empaquetamiento de, 969-973, 972*f*, 973*f*
histonas en, 967-969, 967*f*, 968*f*, 969*f*
variantes, 970*r*-971*r*, 1140-1141, 1141*t*
nucleótido azúcar, **792**
nucleótido cíclico fosfodiesterasa, **448**
hidrólisis de cAMP por, **445***f*, 448
nucleótidos azúcar, 600
en la glucogénesis, 600-602, 602*f*, 603*f*
nucleótidos de flavina, **524**, 525, 525*f*
nucleótidos de piridina, **522**. *Véase también* nicotinamida adenina dinucleótido; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nucleótidos reguladores, 313-314, 313*f*
nucleótidos. *Véase también* nucleótidos específicos **281**, 282*s*
absorción de la luz UV por, 286, 286*f*, 296
azúcar, en glucogénesis, 600-602, 602*f*, 603*f*
bases de. *Véase* bases nitrogenadas
como moléculas reguladoras y señales, 313-314, 313*f*
como transportadores de energía química, 311-312, 311*f*
degradación de,
ácido úrico producido por, 891-894, 890*f*, 892*f*, 893*f*
rutas de recuperación, 892-893
urea producida por, 891-892, 892*f*, 893*f*
en ácidos nucleicos. *Véase* ácidos nucleicos
en cofactores enzimáticos, 313, 312*f*
flavina, 524-525, 525*f*
nomenclatura de, 282*t*, 282
pentosas de, 281-284, 282*f*, 282*t*, 283*f*, 284*f*
piridina, 522
NAD. *Véase* nicotinamida adenina dinucleótido
NADP. *Véase* nicotinamida adenina dinucleótido trifosfato
transformaciones no enzimáticas de, 298-299, 298*f*, 299*f*, 300*f*
transfosforilaciones entre, energía del ATP para, 514, 516*f*
tripletes de codones de, 952, 952*f*, 1071, 1071*f*
determinación de, 1069-1073, 1071*f*, 1072*t*, 1073*f*, 1074*r*-1075*r*, 1076*t*
número de enlace, 959
de superenrollamientos de DNA, 959-961, 960*f*, 961*f*
topoisomerasas que cambían el, 961-963, 962*f*, 963*f*, 963*t*, 964*r*, 965*r*
número de la clasificación de Enzimas (número E.C.), 191
número de recambio, **205**, 205*t*
número E.C. *Véase* número de la Enzyme Commission
Nüsslein-Volhard, Christiane, 1152

O

O-GlcNAc transferasa (OGT), **939**
O_2. *Véase* oxígeno
O^6-metilguanina-DNA-metiltransferasa en, 1002, 1004*f*
obesidad, **931**
diabetes tipo 2 asociada con, 941, 942*f*
gestión de, 942-943, 943*t*
papel de SCD en, 815
regulación hormonal de. *Véase* regulación de la masa corporal

obtención de huella, DNA, 306r-307r
Ochoa, Severo, 1054-1055, 1071-1072
Ogston, Alexander, 632r
OGT. *Véase* O-GlcNAc transferasa
ojo, señalización por GPCR, 456-458, 456f, 458r, 457f
oleato, β oxidación de, 657, 657f
olfato, señalización por GPCR en, 458
oligo (α1⟶6) a (α1⟶4) glucantransferasa, **599**, 600f
oligómero, **141**
oligómeros, **15**
oligomicina, 715
  inhibición de la fosforilación oxidativa por, 725
oligonucleótido, **286**
  intrones de autocorte y empalme con, 1051, 1054f
oligopéptido,**85**
oligosacáridos, **243**, 245
  análisis de, 274-276, 275f, 276f, 277f
  en glucoproteínas, 267, 267f
  en rutas que alimentan la glucólisis, 549, 549f
    enlace glucosídico en, 262-263, 252f, 253t, 253f
  información transportada por, 263, 269-270
    interacciones lectina-glúcido, 273-274, 273f, 274f
    lectura mediante lectinas de, 270-272, 271f, 272f
  nomenclatura de, 251-253, 253t
  sabor dulce de, 254r-255r
olores, detección de, señalización por GPCR en, 458
ω oxidación, **664**, 665, 665f
oncogenes, **480**, 481, 482r-484r, 481-482
  fuentes víricas de, 480, 1057, 1058f
oncometabolitos, 639
ondulado permanente del cabello, 127r
operadores, **1121**, 1112f
operón *his*, 1134
operón *lac*,
  regulación negativa de, 1124-1125, 1124f
  regulación positiva de, 1130-1131, 1131f
operón *leu*, 1134
operón *phe*, 1134
operón *trp*, 1132-1134, 1132f, 1133f
operones, **1123**, 1123f
  his, 1134
  lac,
    regulación negativa de, 1124-1125, 1124f
    regulación positiva de, 1130-1131, 1131f
  leu, 1134
  phe, 1134
  proteína r, 1135-1136, 1135f
  trp, 1132-1134, 1132f, 1133f
opsinas, **456**
  en señalización de la visión, 456-458, 456f, 457f, 458f
ORC. *Véase* complejo de reconocimiento del origen,
ORF que apuntan a, 1073
ORF. *Véase* marco de lectura abierto
organismos vivos,
  acoplamiento energético en, 24-25, 25f
  caracterización de, 1-2, 2f
  células de, 3, 3f
  creación y mantenimiento de orden por, 22-23, 22r-23r,24f
  derivados de hexosas en, 248-250, 249f
  dominios de, 4-5, 4f
  elementos químicos esenciales de, 12, 12f
  en medio acuoso, 69
  energía a partir del flujo de electrones en, 21-22
  estado estacionario dinámico de, 21
    mantenimiento de, 575
  evolución de, información de la secuencia de aminoácidos sobre, 103-107, 106f, 107f, 108f
  fuentes de energía y precursores biosintéticos de, 5-6, 5f
  interacciones estereoespecíficas en 19-20, 19f, 20f
  transformación de la energía y la materia por, 21, 24f
orgánulos
  de células eucarióticas, 7, 8f
  desplazamiento de, 179
  fuerza osmótica de, 57-58
  membranas de, composición de, 388, 389f
orgánulos membranosos, de células eucarióticas, 7, 8f
Orgel, Leslie, 1062
ori. *Véase* origen de replicación
origen de la replicación en el DNA, **982**
  en bacterias, 982, 982f
  origen de replicación (ori), **324**, **982**
    en bacterias, 982, 982f
    en eucariotas, 994
  ornitina descarboxilasa, **880**
    inhibición de, 213r-214r, 880-882
  ornitina transcarbamilasa, **682**
    en el ciclo de la urea, 681-682, 683f, 684f
  ornitina δ-aminotransferasa, **864**, 866f
  ornitina, **81**, 82s
    en el ciclo de la urea, 681, 682, 683f, 684f
    síntesis de prolina a partir de, 864, 866f
  orotato, **882**
    síntesis del anillo de pirimidina como, 882, 885, 886f
  ortofosfato inorgánico (P_i), 505-506, 505f, 505s
    en hidrólisis de ATP, cambio de energía libre en, 507-509, 508f, 508t
  ortólogos, **39**, **106**, **335**
  oseltamivir (Tamiflu), 271, 272f
  osmolaridad, **55**, 56-57, 56f
  ósmosis, 55-57, **56**, 56f
  oso gris, oxidación de ácidos grasos en, 666r
  osteogénesis imperfecta, 130
  oxaloacetato, **624**
    biosíntesis de aminoácidos a partir de, 867-870, 868f-869f
    degradación de aminoácidos a, 688f, 702, 701f
    en el ciclo del ácido cítrico, 622
      como precursor biosintético, 634
      condensación del acetil-CoA con, 623f, 624-625, 624f, 625f
      oxidación del malato a, 632f, 631
      reacciones anapleróticas que proporcionan, 634-635, 635f, 635t
    en el ciclo del glioxilato, 795f, 795
    en la gluconeogénesis, 559-561, 560f
    en la ruta C_4, 789, 791f
  α oxidación **664**, 665f, 666
  β-oxidación, **647**
    como primera fase de la oxidación de ácidos grasos, 652, 653f
    de ácidos grasos de número impar, 658-659, 658f, 660r-661r
    de ácidos grasos insaturados, 657-658, 657f, 658f
    de ácidos grasos saturados
      cuatro pasos básicos de, 653-654, 653f, 655f
      hibernación mantenida energéticamente por, 656r
      oxidación de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico, 655-657, 657t
      repetición de pasos para dar acetil-CoA y ATP, 654-655, 656r
    en peroxisomas, 662-663, 663f
    evolución divergente de, 663-664, 664f
  oxidación de ácidos grasos, 359, 362-363
    α-oxidación, 665, 665f β-oxidación, 647
      de ácidos grasos de número impar, 658-659, 658f, 660r-661r
      de ácidos grasos insaturados, 657-658, 657f, 658f
      de ácidos grasos saturados, 653-657, 653f, 655f, 656r, 657t
      en peroxisomas, 662-663, 663f
      evolución divergente de, 663-664, 664f
    defectos en, 662-663
    ω-oxidación, 665-666, 665f
    regulación de, 659-659f
      factores de transcripción regulan proteínas del catabolismo de lípidos, 662
    fases de, 652-654, 653f
    ácido graso sintasa (FAS), **806**, 807, 808f
    transferencia de grupos acetilo y malonilo a, 808, 809f, 810
    localización celular de, 811, 811f
    múltiples sitios activos de, 808, 808f
      reacciones repetidas de, 806, 807f, 808f, 809f, 810-812, 810f
    estructura de, 806, 807f
  oxidación
    de ácidos grasos. *Véase* oxidación de ácidos grasos de aminoácidos, 677-678, 680f
    de la glucosa
      ATP obtenido a partir de, 633, 633t, 737, 737t
      por la glucólisis. *Véase* glucólisis
      por la ruta de las pentosas fosfato. *Véase* ruta de las pentosas fosfato
    transportadores electrónicos de, 522
    del acetil-CoA. *Véase* ciclo del ácido cítrico
    del gliceraldehído 3-fosfato, como sexto paso en la ruta de la glucólisis, 536f, 540-541, 542f
    del metano, 622-624
    del piruvato, en mitocondrias, 618-621, 619f, 620f, 621f
    variación de energía libre estándar de, 499t
  oxidación de la glucosa
    por la glucólisis. *Véase* glucólisis
    por la ruta de las pentosas fosfato. *Véase* ruta de las pentosas fosfato
    rendimiento en ATP a partir de, 631-633, 633t, 737, 737t
    transportadores electrónicos en la, 521-522
  oxidación de NADH resistente al cianuro, 723
  oxidasas de función mixta, **664**, **696**, **816r**
    en ω-oxidación, 665, 665f
  oxidasas de función mixta, **815**, 816r
    desaturación de ácidos grasos por, 815, 815f, 816r-817r, 818
  oxidasas, 816r
  óxido nítrico (NO), **466**, **906**
    arginina en la biosíntesis de, 880, 881f funciones hormonales de, 907
  oxidorreductasas, 191t, **528**
  oxigenasas, **816r**
  oxígeno (O_2)
    en cloroplastos, 753-754
    transporte por la sangre de, 921-922, 921f, 922f
      esquema Z, 763
    combinación con, transferencias de electrones por, 519
    en la cadena respiratoria mitocondrial, transferencia de electrones por el Complejo IV a, 713t, 714f, 717, 718, 718f, 738f, 739
  oxitiamina, en el tratamiento del cáncer, 547r
  oxitocina, 908f

P

Pace, Norman, 1052
Palade, George, 1106
palíndromo, **291**
  DNA, 291-293, 291f
palmitato,
  síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de, 814, 814f
  síntesis de, 808f, 810-811, 810f
palmitil-CoA
  β oxidación de, 653-657, 653f, 655f, 656r, 657t
  en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, 812-814, 813f
pancreatitis aguda, **677**
pancreatitis, aguda, 677
par ácido-base conjugado, **61**, 61f, 62
  como tampones, 63-67, 64f, 65f, 66f
par redox conjugado, **518**
paradoja de Levinthal, 145
paraganglioma hereditario, 715-716
paraganglioma, 715-716
parálisis periódica hipercaliémica, 430, 430t
parálogos, **38**, **106**, **335**
paramiosina, **162**
paramiotonía congénita, 430, 430t
parásitos, lectinas de, 271-272
paredes celulares bacterianas, heteropolisacáridos en, 259-260, 260f
paredes celulares de las algas, heteropolisacáridos en, 259-260, 260f
paredes celulares, bacterianas y de algas, heteropolisacáridos en, 259-260, 260f
pares de bases, **286**, 287f
  determinación de la estructura del DNA y, 287-289, 289f
  en el reconocimiento codón-anticodón, 1076-1077, 1076f, 1077t
  en la replicación del DNA, 983-985, 984f, 985f
  en transcripción, 1030
  estabilidad del DNA y, 298
  Hoogsteen, 292, 292f
  RNA, 293-295, 294f, 296f
parkinsonismo, plegamiento incorrecto de proteínas en, 149
partícula de reconocimiento de la señal, **1106**, 1107f
paso limitante de velocidad, **184**
  en rutas metabólicas, 582
Pasteur, Louis, 17, 18r, 189, 545, 573
Pauling, Linus, 104, 117-118, 120-123, 197
pBR322, 324-325, 324f, 325f
PCNA. *Véase* antígeno nuclear de células en proliferación
PCR cuantitativa (qPCR), **333**, 333f, 334f
PCR en tiempo real, **333**, 333f, 334f
PCR por transcriptasa inversa (RT-PCR), **333**

PCr. *Véase* fosfocreatina
PCR. *Véase* reacción en cadena de la polimerasa
PDB. *Véase* Protein Data Bank
PDE. *Véase* fosfodiesterasa
PDGFR. *Véase* receptor del factor de crecimiento de plaquetas
PDH. *Véase* piruvato deshidrogenasa
PDI. *Véase* proteína disulfuro isomerasa
pelagra, 524, 525f
pelo, estructura de, 126-127, 126f, 127r
penicilina, 225-227, 226f, 227f
pentosas fosfato, movimiento de, 799, 798f
pentosas, 244, 244f
en nucleótidos y ácidos nucleicos, 281-284, 282f, 282t, 283f, 284f
PEP. *Véase* fosfoenolpiruvato
pepsina, 675-677, 676f
pepsinógeno, **675**, 676f
peptidil transferasa, **1096**, 1097f
péptido C, 903, 904f
péptido catalítico editor del mRNA de *apoB* (APOBEC), **1078**, 1078f, 1079, 1079f
péptido prolil cis-trans isomerasa (PPI), 147
péptido tipo glucagón-1 (GLP-1), 909f, **909**, 910t
moduladores de, 943t
péptido YY (PYY_{3-36}), **909**, 910t, **938**
regulación de la masa corporal por, 938-940, 939f
peptidoglucano,
estructura de, 260, 260f
estructuras y funciones, 262f
interferencia de la penicilina con, 225
reacción de la lisozima con, 223-225, 223f, 224f
péptidos, **85**
aminoácidos en, 85-86, 86f
comportamiento de ionización de, 86, 88f
síntesis química de, 102, 103f, 104t
tamaños y composiciones de, 86-87, 87t, 88t
perfil (profiling) ribosómica 1103, 1103f
perfiles
DNA, 306r-307r ribosoma, 1103, 1103f
perilipinas, **649**
permeabilidad, de membranas, 389, 389f
peróxido de hidrógeno, producción por la cadena respiratoria mitocondrial de, 716
peroxisomas, **7**, 8f, **662**
α oxidación en, 665-666, 665 β oxidación en, 662-663, 663f
Perutz, Max, 142, 164
peso molecular, 13r
de polisacáridos, 255
de proteínas, estimación de, 94, 94f
PET. *Véase* tomografía de emisión de positrones
PFK-1. *Véase* fosfofructoquinasa-1
PFK-2. *Véase* fosfofructoquinasa-2
PG. *Véase* prostaglandinas
PGE_2. *Véase* prostaglandina E_2
pH isoeléctrico, **84**
pH neutro, **60**
pH óptimo, **67**, 67f
pH, **60**
cinética enzimática y, 208, 208f
disminución por la fermentación del, 555-557
efectos sobre la unión del oxígeno del, 170-171, 170f
isoeléctrico, 84 neutro, 59
respuesta de la quimotripsina al, 217-220, 217f
tamponamiento del, 63
ecuación de Henderson-Hasselbalch para, 64-65
en células y tejidos, 65-68, 65f, 66f, 67f, 68r
pares ácido-base conjugados 65-67, 64f, 65f, 66f
Phillips, David, 223, 225
P_i. *Véase* ortofosfato inorgánico
pI. *Véase* punto isoeléctrico
PI3K. *Véase* fosfoinosítido 3-quinasa
PIC. *Véase* complejo de preinicio
piericidina A, 715, 715t
pigmentos accesorios, **755**
pigmentos, lípidos como, 379, 379f
β-pineno, 375
pinzones de las Galápagos, 1158r-1159r
pinzones, Galápagos, 1158r-1159r
pioglitazona (Actos), 943t
PIP_2. *Véase* fosfoatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP_3. *Véase* fosfatidilinositol, 3,4,5-trisfosfato
piranosas, **246**, 247f, 248
conformaciones de, 248, 248f
piridoxal fosfato (PLP), **677**
en el metabolismo de serina y glicina, 692, 693f
en la reacción de la glucógeno fosforilasa, 599, 599f, 600f
en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato, 677, 677f, 678f, 679f
piridoxina. *Véase* vitamina B_6
pirofosfato inorgánico (PP_i), 505, 793
pirosecuenciación, **308**, 308f, 309
pirrolisina, **61**, 82s
en el código genético, 1092r
piruvato carboxilasa, **559**, **634**
biotina en, 635-637, 636f, 637f
en gliceroneogénesis, 823, 823f
en gluconeogénesis, 559-561, 560f
oxalacetato producido por, **634**, 635f, 635t
piruvato descarboxilasa, **553**
tiamina pirofosfato en reacciones de, 555, 555f, 558t
piruvato deshidrogenasa (PDH), **619**, 620, 620f
canalización de sustratos en, 620-621, 621f
en condiciones hipóxicas, 737-739, 738f
en el hígado, 912-913, 913f
piruvato deshidrogenasa quinasa, 637-638
piruvato fosfato diquinasa, **780**, 791f
piruvato quinasa **544**
en la ruta glucolítica, 363f, 544
inhibición por ATP de, 592-593, 593f, 594f
piruvato, **544**
acetil-CoA a partir de la oxidación de, 617
canalización de sustratos en el complejo PDH, 620-621, 621f
coenzimas del complejo PDH, 619, 619f, 620f
enzimas del complejo PDH, 619-620, 620f
reacción de descarboxilación oxidativa, 618-619, 619f
regulación alostérica y covalente de, 637-638, 638f
biosíntesis de aminoácidos a partir de, 867-870, 868f-869f
de la glucólisis, 533-534, 533f, 535f
destinos de, 536-537, 537f, 618
energía remanente en, 537
por transferencia de grupo fosforilo a partir desde el fosfoenolpiruvato al ADP, 538f, 544
degradación de aminoácidos a, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
fermentación de, 536
ácido láctico, 551-552, 551f, 552t, 553r
alimentos y productos químicos industriales producidos por, 555-557
etanol, 537, 537f, 553, 553f, 554r
tiamina pirofosfato en, 555, 555f, 558t
PEP producido a partir de, 558-561, 560f, 561f
regulación de, 593-594, 593f, 594f
síntesis de glucosa a partir de, 557, 559f, 558-561, 560f, 561f
Pitágoras, 566r
pK_a, 61f, **62**
de ácidos débiles, 62-63, 62f, 63f
de aminoácidos, 77t 81-85, 83f, 84f, 85f
en la ecuación de Henderson-Hasselbalch, 64-65
PKA. *Véase* proteína quinasa A
PKB. *Véase* proteína quinasa B
PKC. *Véase* proteína quinasa C
PKG. *Véase* proteína quinasa G
PKU. *Véase* fenilcetonuria
placas, ateroscleróticas, 843, 843f
medicamentos estatinas y, 843, 845r-846r
transporte inverso de colesterol por HDL contrarresta las, 844, 844f
Planctomicetos, 856r-857r
plantas
asimilación de CO_2 en, 775, 775f
activación por la luz en, 783-785, 785f
conversión de 3-fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato, 778-779, 780f
fases de, 777, 775f
fijación de CO_2, 777-778, 776f, 778f, 779f
necesidades de NADPH y ATP en, 793-794, 783f
regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato, 779, 781f, 782f, 783f,
sistemas de transporte para, 781-783, 784f
C_3, 777
C_4, 789
CAM, 792
centro de reacción fotoquímico en, 762-763, 762f
derivados de aminoácidos en, 880, 880f
desaturasas en, 815, 815f
fondos (pools) de metabolitos en, 799, 798f
fotorrespiración en. *Véase* fotorrespiración
fotosíntesis en. *Véase* fotosíntesis
fotosistema I, 765, 764f
fotosistema II, 763- 765, 763f, 764f
gluconeogénesis en, 794-796, 794f, 795f
obtenidas por ingeniería genética, 788, 788r-789r
presión osmótica en, 57
respiración mitocondrial en, 786
bacterias fijadoras de nitrógeno simbiontes de, 855, 859-860, 860f
ruta del glicolato en, 787, 787f, 788, 790f
señalización en, 474-475, 475f
síntesis de ácidos grasos en, 806, 811, 811f, 814-815, 815f
síntesis de celulosa en, 796-797, 796f
síntesis de icosanoides en, 820
plantas C_3, **777**
fotosíntesis en, 788-791, 791f
plantas C_4, **789**
fotosíntesis en, 788-791, 791f
plantas CAM, **792**
plantas leguminosas, simbiontes bacterianos fijadores de nitrógeno, 855, 859-860, 860f
plantas vasculares, señales lipídicas volátiles en, 375
plaquetas, **234**, **921**, 921f
en la coagulación de fase de beneficios en la sangre, 234-235, 234f
plasma sanguíneo, **921**, 921f
plasmalógenos, **367**, 367f
síntesis de, 828-829, 830f
plásmidos, **7**, **953**, 954f
como vectores de clonación, 324-325, 324f, 325f
plasmodesmos, 790
plastidios, **753**, 754f
plastocianina, **763**
flujo electrónico cíclico con, 765,-766
plastoma, **753**
plastoquinona, 377f, 378, **765**
Plavix. *Véase* clopidogrel
PLC. *Véase* fosfolipasa C
plegamiento de unión de nucleótido, **313**
plegamiento proteico asistido, 146-147, 147f, 148f
plegamiento,
de homopolisacáridos, 258-259, 258f, 259f, 260f
de proteínas, 142-143, 143f
asistido, 146-147, 147f, 148f
como etapa final de la síntesis, 1080f, 1081, 1081t
defectos en, 147-151, 149f, 150r-151r
papel de la secuencia de aminoácidos en, 144, 144f
proceso a pasos de, 1100-1103, 1102f
de ribosomas, 1081-1082
pliegue de la inmunoglobulina, **177**
pliegue de Rossmann, 523, 523f
pliegues, **137**
de proteínas globulares, 133t, 137-138, 137f, 138f
PLP. *Véase* piridoxal fosfato
Pol I. *Véase* polimerasa I
Pol II. *Véase* polimerasa II
Pol III. *Véase* polimerasa II
Polanyl, Michael, 197
polar, grupos R no cargados, 79f, 80-81, 81f
polaridad, **79**, **1152**
de aminoácidos, 79
poliadenilato polimerasa, **1045**
policétidos, **379**, 379f
policonectores, 323f, **323**
polifosfato inorgánico (poliP), 516s
como dador de grupos fosforilo, 516
polifosfato quinasa-1 (PPK-1), **516**
polifosfato quinasa-2 (PPK-2), **516**
polimorfismos de secuencia, **306r**
en genotipado del DNA, 306r-307r
polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), **346**
en el genoma humano, 344r, 346-347, 347f
polinucleótido fosforilasa, **1054**, 1071
polinucleótido, **286**
polirnjcleótidos, 15-16
poliP. *Véase* polifosfato inorgánico
polipéptido amiloide del islote (IAPP), 149
polipéptido inhibidor gástrico, 909f, **909**, 910t
polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP), 909f, **909**, 910t
polipéptidos, **85**
codificación por mRNA de, 293, 293f
proceso de plegamiento de, 145-146, 145f, 146f
secuenciación de, 96-97, 97f
métodos clásicos para, 97-99, 98f, 99f, 100f, 100t
métodos por espectrometría de masas para, 100-101, 101f, 102f
tamaños y composiciones, 86-87, 87t, 88t

Copy Station

polisacáridos, **15**, **243**
análisis de, 274-276, 275f, 276f, 277f
en rutas de alimentación de la glucólisis, fosforólisis de, 550-551, 549f, 550f
hidrólisis de, 549, 549f
estructuras y papeles de, 262t
hetero-, 254-255, 254f
en las paredes celulares de bacterias y algas, 259-260, 260f
glucosaminoglucanos en ECM, 260-262, 260f
homo-, 254-255, 254f
funciones de almacenamiento energético, 255-257, 256f
papeles estructurales de, 257-258, 257f, 258f
plegamiento de, 258-259, 258f, 259f, 260f
información transportada por, 263, 269-270
interacciones lectina-glúcido, 273-274, 273f, 274f
lectura por lectinas de, 270-272, 271f, 272f
nomenclatura de, 252-253, 253t
pesos moleculares de, 255
polisomas, **1100**, 1101f, 1099-1101
poliuria, 424
POMC. *Véase* pro-opiomelanocortina
Popják, George, 833
porfiria intermitente aguda, 878r
porfirias, **876**, 878r
porfirinas, **875**
degradación de, 876-878, 877f
glicina en la biosíntesis de, 875-876, 876f, 877f, 878r
porfobilinógeno, **875**, 876f, 877f
porinas, **395**
barriles β en, 395
poros nucleares, 1109, 1110f
posiciones Hoogsteen, **282**
potencial de fosforilación (ΔG_p), **507**
cálculo de, 507-509
potencial de membrana (V_m), **406**
desplazamiento de solutos y, 406, 406f
en señalización eléctrica, 470-471, 471f
en señalización neuronal 471, 472f
potencial de receptor, **458**
potencial de reducción (E), 519-520, 519f
cálculo del cambio de energía libre a partir de, 520-521, 521t
de medias reacciones biológicamente importantes, 521t
de transportadores electrónicos en la cadena respiratoria mitocondrial, 712-713, 716t
potencial de reducción estándar ($E°$), **519**, 519f, 520
cálculo del cambio de energía libre a partir de, 520-521, 521t
de medias reacciones biológicamente importantes, 521t
de transportadores electrónicos de la cadena respiratoria mitocondrial, 712-712, 712t
potencial electroquímico, **406**, 406f
potenciales de acción, canales iónicos de apertura por voltaje que producen, 471, 472
PP1. *Véase* fosfoproteína fosfatasa 1
PP2A. *Véase* fosfoproteína fosfatasa 2ª
PPAR α,
PPAR. *Véase* receptores de peroxisomas activados por proliferador,
PPARβ,
PPARγ,
PPARδ,
ppGpp, como molécula reguladora, 313, 313f
PPI. *Véase* péptido prolil cis-trans isomerasa
PP_i. *Véase* pirofosfato inorgánico
PPK-1. *Véase* polifosfato quinasa 1
PPK-2. *Véase* polifosfato quinasa 2
PQ_A, **765**
PQ_B, 765
PQ_BH_2, 765
Pravachol. *Véase* pravastatina
Pravastatina, 845r-846r
pRb. *Véase* proteína del retinoblastoma
pre-RC. *Véase* complejos pre-replicativos
pre-RNA. *Véase* RNA prerribosómicos
prebióticos, **940**
prednisolona, como medicamento esteroide, 374, 374f
prednisona, como medicamento esteroide, 374, 374f
prefenato, en biosíntesis de aminoácidos, 871
preferencia codónica, **1075**
prenilación, 847
preproinsulina, 904, 904f
presenilina-1, gen que codifica, 350-351, 351f
presión osmótica, 55-57, 56f
presión parcial, **66**
primaquina, 566r
primasa, **987**, 989t991, 991f, 992t
primates, comparaciones del genoma humano con, 348-349, 348f, 349f, 350
primera ley de la termodinámica, 21
bioenergética y, 496-497, 497t
primosoma de reinicio de la replicación, **1010**
primosoma, **991**
reinicio de la replicación, 1010
pro-opiomelanocortina (POMC), 904, 904f, 905f
probióticos, **940**
procarboxipeptidasas A y B, **675**, 676-677
procariotas, **3**
células de, 6-7, 6f
procesado de RNA, 1039-1040, 1040f
corte y empalme alternativo, 1046-1047, 1046f, 1047f
corte y empalme de intrones, 1041-1044, 1041f, 1042f, 1043f, 1044f
de RNA de funciones especiales, 1050, 1051f
de RNA de transferencia, 1049-1050, 1050f
de RNA mensajeros, 1046
casquete 5' de, 1040-1041, 1040f
extremo 3' de, 1045, 1045f, 1046f
velocidad de degradación de, 1053-1054
de RNA ribosómico
en bacterias, 1047-1048, 1048f
en eucariotas, 1047-1049, 1049f, 1060f
polinucleótido fosforilasa, 1054
ribozimas, 1051-1053, 1052f, 1053f, 1054f
transcripción de exones, 1041
transcripción de intrones, 1041
transcritos primarios, 1039-1040, 1040f
procesamiento proteolítico, postraducción, 1102
procesividad, de las DNA polimerasas, **984**
procesos fotosintéticos, **36**
producción de calor, temblores, 919
producto iónico del agua, **59**
productos finales de la glicación avanzada (AGE), 260f
productos, concentración de, determinación de los cambios de energía libre a partir de, 508-509
proenzimas, **232**
profase I en meiosis, 1011, 1013
progesterona, **844**, 845s
síntesis de, 844-845, 844f, 847f
proinsulina, 904, 904f, 905f
prolil 4-hidroxilasa, 129r
prolina, **79**, 79s, **698**, **864**
biosíntesis de, 864, 865f, 866f
catabolismo de, 688f, 698, 698f
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
promotor del lado 5' (UP), 1030
promotor Lac, expresión de proteína recombinante mediante, 328
promotor T7, expresión de proteína recombinante con el uso de, 328, 329f
promotores y, 1030
promotores, **1030**
de *Escherichia coli*, 1030-1031, 1033f, 1034t
de Pol II, 1142-1145, 1143f, 1145f
en la transcripción, 1030-1031, 1031f, 1033
regulación positiva de eucarióticos, 1141-1142, 1142f
RNA polimerasa II y, 1034, 1035f
transcripción con, 1037f, 1038-1038
RNA polimerasa III y, 1034
unión de la RNA polimerasa al DNA en, 1120-1121, 1120f
propiedades coligativas, **55**
de soluciones acuosas, 55-58, 56f
propionato, **658**, 940
β oxidación de, 657-658, 658f
propionil-CoA carboxilasa, 658f, **658**
propionil-CoA, **658**
β oxidación de, 658-659, 658f
Propionobacterium freudenreichii, 557
proplastidios, **759**, 753f, 754f
propranolol, 441s
proproteínas, **233**
prostaglandina E_2 (PGE_2), señalización del cAMP por, 449
prostaglandina H_2 sintasa, **816**
en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, 818-819, 818f
inhibición de, 373-374, 373f, 819
prostaglandinas (PG), **373**, 373f, **818**, 904
síntesis de, 818-819, 818f
proteasas, **98**, 99, 100t
mecanismos de,
quimotripsina, 216-220, 216f, 217f, 218f-219f
tratamientos basados en, 220, 220f, 221f
zimógenos, 232-233, 234f
proteasoma 26S, **1112**
en la degradación de proteínas, 1112-1114, 1113f
proteasomas, **3**, **478**
en la degradación de ciclinas, 478, 478f
en la degradación de proteínas, 1112-1114, 1113f, 1113t
protectinas, 820
Protein Data Bank (PDB), 132r, 140-141, 140f
proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2), 461, 463, 462f
proteína activadora de la rotura de SREBP (SCAP), **841**, 841f, 842, 842f
proteína Alk B, 1003-1004, 1004f
proteína alostérica, **166**
proteína B pequeña, 1099, 1101f
proteína C, **182**
proteína C, **235**, 235f
proteína Caudal, 1154, 1154f, 1155f
proteína de replicación A (RPA), **996**
proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP), **418**
proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular, 1109, 1110f
proteína de unión a DNA de cadena sencilla, 989t, 990, 992t
proteína de unión a nucleótido de guanosina, **440**
proteína de unión a TATA (TBP), 1037f, 1036-1037, **1144**, 1145f
proteína de unión al elemento de respuesta a glúcidos (ChREBP), **595**, 594f
proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB), **449**, **596**, **1149**
proteína del retinoblastoma (pRb),
mutaciones en, 481-482
regulación del ciclo celular por, 479f, 480
proteína desacoplante 1 (UCP1), 715t, **740**, **915**
en la producción de calor mitocondrial, 740, 740f
en tejido adiposo marrón, 740, 740f, 916
estimulación por leptina de, 933, 934f
proteína disulfuro isomerasa, 147
proteína DnaA, 988-989, 989t, 990f
proteína DnaC, 1010
en el inicio de la replicación, 989t, 990, 990f
proteína DnaG. *Véase* primasa
proteína DnaT, 1010
proteína ELL, 1036t, 1037f
proteína fluorescente amarilla (YFP), 452r-453r
proteína fluorescente azul (BFP), 452r-453r
proteína fluorescente cian (CFP), 452r-453r
proteína fosfatasas, **231**
proteína G estimuladora (G_s), **441**
en la señalización β-adrenérgica, 441-443, 445f, 446f, 442r-444r, 445
terminación de, 448
otras señales reguladoras que utilizan, 449-450
proteína G inhibidora (G_i), **449**
proteína génica inducida por insulina (Insig), **841**, 841f, 842, 842f
proteína HA. *Véase* proteína hemaglutinina
proteína hemaglutinina (HA), 271, 176t
proteína HU, 989, 989t, 990f
proteína Hunchback, 1154, 1154f, 1155f
proteína Ku70, 1015-1016-1018f
proteína Ku80, 1015-1016-1016f
proteína M, **182**
proteína multifuncional (MFP), **664**, 664f
proteína MutH, en reparación de apareamientos incorrectos, 998-1000, 999f, 1007r
proteína MutL, en reparación de apareamientos incorrectos, 998-1000, 999f, 1007r
proteína MutS, en reparación de apareamientos incorrectos, 998-1000, 999f, 1007r
proteína NusA, 1031
proteína NusG, 1031
proteína p21,
mutaciones en, 481
regulación del ciclo celular por, 479-480, 479f
proteína p27, 138-140
proteína p53, 139-140, 139f
en tumores, 481, 546r
regulación del ciclo celular por, 479-480, 479f
proteína portadora de acilos (ACP), **808**, 808f
transferencia de grupos acetilo y malonilo a, 808, 809f, 810

proteína PriA, 1010
proteína PriB, 1010
proteína PriC, 1010
proteína priónica (PrP), **150r**
proteína pTEFb, 1036t, 1037f, 1038
proteína Pumilio, 1154, 1154f, 1155f
proteína quinasa A (PKA), **441**
en la movilización de triacilgliceroles, 649, 650f
en señalización por GPCR,
sistema β-adrenérgico, 441-446, 445f, 446f, 447f, 447t
otras moléculas reguladoras que utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
estudios FRET de, 452r-453r
proteína quinasa activada por AMP (AMPK), **934**
acciones de la adiponectina a través de, 935, 936f
coordinación de anabolismo y catabolismo por, 935-936, 936f, 937f
en la regulación de la oxidación de ácidos grasos, 659f, 662
en la regulación metabólica, 580-581, 581f
en la señalización hormonal, 907-908, 908f-909f
estimulación por la leptina de, 934
estructura de, 935-936, 937f
proteína quinasa B (PKB), 463-464, 463f
proteína quinasa C (PKC), **451**
en señalización por GPCR, 450-451, 454f
proteína quinasa dependiente de cAMP, **441**
en la señalización de GPCR,
otras moléculas reguladoras que utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
sistema β-adrenérgico, 441-444, 445f, 445- 446, 447f, 447t
estudios FRET de, 452- 453r
proteína quinasa dependiente de cGMP, **466**, 465f, 466
proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK), **476**
regulación del ciclo celular por,
fosforilación de proteínas en, 479-480, 479f
niveles oscilantes de CDK en, 476-479, 476f, 477f, 478f, 479f
regulación por el factor de crecimiento de, 478, 479f
inhibición de, 476f
para el tratamiento del cáncer, 482r-483r
proteína quinasa G I(PKG), **465**, 465f, 466
proteína quinasas activadas por mitógeno (MAPK), **462**, 463
proteína quinasas, **231**, 232, 233f
activación alostérica de, 444, 446f
en plantas, 474-475
inhibición de, para el tratamiento del cáncer, 482r-483r
oncogenes que codifican, 480, 482r-483r
regulación del ciclo celular por, 476
fosforilación de proteínas en, 479-480, 479f
niveles oscilantes de CDK en, 476-479, 476f, 477f, 478f, 479f
secuencias consenso para, 232, 233t
Tyr. Véase tirosina quinasas de receptor
proteína RAG1, 1021
proteína RAG2, 1021
proteína RecA, 1019, 1010f
en la inducción de la respuesta SOS, 1134, 1134f
proteína receptora de cAMP (CRP), **1031**, **1130**, 1131, 1131f
proteína reconocedora de la secuencia de destrucción (DBRP), 478, 478f
proteína reguladora de la conductancia transmembrana en la
proteína S, **235**
proteína SII, 1036f, 1037t, 1038
proteína SIII, 1036t, 1037f, 1039
proteína tau, 150
proteína TBP, 1036, 1038t, 1037f
proteína TFIIA 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIIB, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIID, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIIE, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIIF, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIIH, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína TFIIS, 1036-1038, 1036t, 1037f
proteína tirosina fosfatasas (PTP), 467, 468
proteína trifuncional (TFP), **654**
defectos genéticos en, 662
proteína UmuC, 1004-1005, 1006t
proteína UmuD, 1004-1005, 1006t
proteína verde fluorescente (GFP), **336**, **452**
estudio de rutas de señalización mediante, 450, 452r-453r
localización de proteínas mediante, 336-338, 337f, 338f
proteínas activadoras de la GTPasa (GAP), **448r**, 459
en señalización β-adrenérgica, 448
proteínas adaptadoras multivalentes, 467-468, 467f, 468f, 469f, 470f
proteínas adaptadoras, **450**
multivalentes, 467-470, 468f, 469f, 470f
proteínas anfitrópicas, **392**, 392f
asociaciones reversibles de, 397
proteínas con anclas GPI, **397**
en balsas de colesterol-esfingolípido, 401-402, 401f, 402f
proteínas conjugadas, **88**, 89t
proteínas de anclado de la quinasa A (AKAP), **450**, 451f
proteínas de armazón, 438
proteínas de fusión, **331**, **404**
localización de proteínas con, 336-338, 337f, 338f
para el análisis de dos híbridos de levadura, 339-340, 340f
para la inmunoprecipitación, 338-339, 338f
proteínas de la dieta, degradación enzimática de, 675-677, 676f
proteínas de los filamentos intermedios (IF), 126
proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM), **995**
proteínas de membrana,
anfitrópicas, 392, 392f
asociación reversible de, 397
características, 388, 388t, 389f
difusión lateral de, 400-401, 401f
en balsas de colesterol-esfingolípidos, 401-402, 401f, 402f
integrales, 391-392, 392f
adhesión a la superficie, señalización y otros procesos de, 405
caveolinas, 402-403, 402f
regiones hidrofóbicas de, 393-394, 393f, 394f
secuencias de aminoácidos en, 394-395, 395f, 396f
topología de, 392-395, 393f, 395f, 396f
orientación de, 392-395, 393f, 395f, 396f
periféricas, 392, 392f
unión covalente de, 397
proteínas de transporte. *Véase* transportadores
proteínas de señalización al glucógeno, **609**, 610f
proteínas de transferencia de fosfatidilinositol, 399
proteínas de unión al DNA, **987**, 990f
proteínas de unión al elemento regulador de esteroles (SREBP), **595**, **841**, 841f, 842, 842f
proteínas de unión al oxígeno,
descripción cuantitativa de la unión por, 160-162, 161t, 166-167, 167f
estructura de las subunidades de la hemoglobina, 163-164, 163f, 164f
familia de las globinas, 159
fijación de monóxido de carbono por la hemoglobina, 168r-169r
fijación de oxígeno por la hemoglobina, 164-166, 165f, 166f, 167f, 171-172, 171f, 172f
fijación de oxígeno por la mioglobina, 159, 159f
fijación del oxígeno por el hemo, 158-159, 158f, 159f
hemoglobina en la anemia falciforme, 172-173, 172f, 173f
influencias estructurales sobre la fijación por, 162-163, 162f
modelos mecanísticos para, 168-170, 170f
regulación de, 171-172, 171f, 172f
transporte de CO_2 por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de iones hidrógeno por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de oxígeno por la hemoglobina, 163
unión cooperativa por, 165-169, 166f, 167f, 170f
proteínas ferro-sulfuradas de Rieske, **712**
proteínas ferro-sulfuradas, **712**
en la cadena respiratoria mitocondrial, 712, 712f
proteínas fibrosas, **125**
estructura de, 125-126, 126t
colágeno, 127f, 128r-129r, 130f, 130-131
fibroína de la seda, 131, 131f
α-queratina, 126-127, 126f, 127r
proteínas flagelina, 1138, 1138f, 1139t
proteínas G pequeñas, **462**
proteínas G triméricas, **441**
proteínas G, **440**
como interruptores moleculares, 441, 442r-444r, 446f, 448, 459-460
defectos en, 440-441, 444r
G_i, 449
G_{olf}, 458
G_q, 450
G_s, 441, 442r-444r, 445, 445f, 446f, 448
gustducina, 458
Ras, 442r
en cáncer, 443r
en señalización INSR, 460-462, 462f
oncogenes que codifican, 480, 481, 482r-484r
transducina, 456-458, 456f, 457f, 458r
proteínas globulares, 125
estructura de, 131, 131f, 132r
clasificación basada en, 140-141, 140f
mioglobina, 131-133, 132f, 133f, 134r-136r
motivos y dominios, 133-137, 133t, 138, 137f, 138f
proteínas homólogas, **106**
proteínas IF. *Véase* proteínas de los filamentos intermedios,
proteínas integrales de membrana monotópicas, **391**, 392f
proteínas integrales de membrana politópicas, **391**, 392f
proteínas integrales de membrana, **391**, 392, 392f
adhesión a la superficie, señalización, y otros procesos de, 405
caveolinas, 402, 402f
proteínas intrínsecamente desordenadas, **139**, 139f, 140
proteínas MCM. *Véase* proteínas de mantenimiento de minicromosomas
proteínas modulares, **438**
proteínas motor, en músculo,
energía del ATP para, 511, 514
interacciones de, 183-184, 182f, 183f
metabolismo muscular para, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
miosina y actina, 179, 180f
proteínas oligoméricas, **97**
proteínas periféricas de membrana, **391**, 392f
unión covalente de, 395-397, 396f
proteínas plasmáticas, **921**, 921f
proteínas poliméricas, **97**
proteínas reguladoras del hierro (IRP1, IRP2), **626r**, 627r
proteínas reguladoras, **228**
dominios de interacción proteína-proteína de, 1128-1130, 1129f
dominios de unión al DNA en, 1125-1128, 1125f, 1126f, 1127f, 1128f
en el desarrollo, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
proteínas ribosómicas (r-proteínas), síntesis de, coordinación de la síntesis de rRNA con, 1135-1136, 1135f, 1136f
proteínas SMC, 973f, **974**, 974, 975f
proteínas subunidades múltiples, **87**
proteínas, 10f, **15**, 16, **85**
adaptadoras, 450
multivalentes, 467-468, 467f, 468f, 469f, 470f
alostéricas, 166
alteradas, 330-331, 331f
aminoácidos en, 10f, 15, 78, 85-88, 87t, 88t
caracterización de, 92-94, 93f, 94f, 95f
codificación en el DNA de, 31-32, 32f
codificación en el mRNA de, 293, 294f
como transportadores electrónicos, 521
concentración celular de, 1119, 1120f
convenciones en la nomenclatura de, 979
corte y empalme alternativo y, 1045-1047, 1046f, 1047f
cuantificación de, 94-96, 96f
de andamio, 438, 467-468, 467f, 468f, 469f, 470f
de fusión, 331-333
localización de proteínas con, 336-338, 337f, 338f
para análisis de dos híbridos en levaduras, 339-340, 340f
para la inmunoprecipitación, 338-339, 338f, 339f
degradación de
en hígado, 913f, 914
en la regulación metabólica, 576, 576f, 576t
oxidación y producción de urea. *Véase* catabolismo de aminoácidos
sistemas especializados que facilitan, 1112-1114, 1113f, 1113t
desnaturalización de, 142, 143f
pérdida de función con, 143-144, 143f

renaturalización después de, 144, 144f
determinación de la masa molecular de, 94, 94t
digestión de, 675-677, 676f
en la respuesta inmune, 174-176, 175t
en membranas. *Véase* proteínas de membrana
estructura de
capas de, 96, 96f
comparaciones de, 335-336, 335f
cuaternaria. *Véase* estructura cuaternaria
determinación de, 134r-136r
efectos del enlace peptídico sobre, 118-119, 118f, 119f
interacciones débiles que estabilizan, 116-118
primaria. *Véase* estructura primaria
secundaria. *Véase* estructura secundaria
terciaria. *Véase* estructura terciaria
tridimensional, 31-32, 32f, 115, 115f, 134r-136r
unión de ligandos y, 162-163, 162f
fijadoras de oxígeno. *Véase* proteínas fijadoras de oxígeno
glucosilación de, 267-268, 268f
grupos químicos en, 88, 89t
homólogas, 106
localización de, 336-338, 337f, 338f
los enzimas como, 188. *Véase también* enzimas
modular, 438
motoras. *Véase* proteínas motora
papel de la secuencia de aminoácidos en, 143-144, 144f
proceso a pasos de, 145-146, 145f, 146f
pI de, determinación de, 94, 95f
plegamiento de, 142-143, 143f
asistida, 146-147, 147f, 148f
como paso final de la síntesis, 1080f, 1081, 1081t, 1101-1102, 1102f
defectos en 147-151, 149f
producción amplificada de,
alteradas, 330-331, 331f
etiquetas para la purificación de, 331-332, 332f, 332t
sistemas bacterianos utilizados para, 328, 329f
sistemas celulares de mamíferos utilizados en, 329
sistemas de insectos y de virus de insectos utilizados en, 329, 330f
sistemas de levaduras utilizados en, 329
vectores de expresión para, 327-328, 328f
purificación de, 88-92, 90f, 91f, 93t
etiquetas para la, 331-333, 332f, 332t
inmunoprecipitación, 338-339, 338f, 339f
regulación de la transcripción por, 1031
regulación del inicio de la transcripción por, 1121-1123, 1121f, 1122f
reguladoras, 228-229
dominios de interacción proteína-proteína en, 1128-1130, 1129f
dominios de unión al DNA en, 1125-1128, 1125f, 1126f, 1127f, 1128f
en el desarrollo, 1151-1157, 1152f, 1153f, 1154f, 1155f, 1156f
ribosómicas, 1135-1136, 1135f, 1136f
secuenciación de, 96-97, 97f
métodos clásicos de, 97-99, 98f, 99f, 100f, 100t
métodos de espectrometría de masas para, 100-102, 101f, 102f
señalización,
adaptadoras multivalentes, 467-468, 467f, 468f, 469f, 470f
GPCR. *Véase* receptores acoplados a proteínas G
guanilil ciclasas, 465-466, 465f
nomenclatura de, 439-440
RTK. *Véase* receptores tirosina quinasas
segregación de, 466, 468-469
tipos de, 439, 440f
separación de
cromatografía en columna, 88-90, 90f, 91f, 93t
diálisis, 89
electroforesis, 92-94, 93f, 94f, 95f
síntesis química de, 102, 103f, 104t
tamaños y composiciones de, 86-87, 87t, 88t
vida media de, 576, 576t, 1113, 1113t
proteoglucanos, **263**
estructura y función de, 263-267, 263f, 264f, 265f, 267f
implicados en enfermedades humanas, 266r
proteoma **15**, **577**
proteómica, **15**
proteostasis, **142**, 143f
proto-oncogenes, **480**
protómeros, **87**, **141**
protones, transferencia de, catálisis por, 199-200, 199f
protoporfirina, **158**, 158f, **876**, 876f, 877f
protrombina, 378
PrP. *Véase* proteína priónica
PRPP. *Véase* 5-fosforribosil-1-pirofosfato
prueba de Ames, 997, 997f
prueba de tolerancia a la glucosa, **931**
prueba SCK, 686r
Prusiner, Stanley, 150r
Pseudouridina 1046f
PSI. *Véase* fotosistema I
PSII. *Véase* fotosistema II
PTEN, 463
PTP. *Véase* proteína tirosina fosfatasas
PTPC. *Véase* complejo del poro de transición de permeabilidad
puente de tetrasacárido, en los proteoglucanos, 263, 264f
puente salino, estructura proteica y, 117
PUFA. *Véase* ácidos grasos poliinsaturados
punto de ebullición
de solventes comunes, 48t del agua, 47-49, **48t**
punto de fusión
de ácidos grasos, 360t, 361 de disolventes comunes, 48t del agua, 47-49, 48t del DNA, 295-297, 297f
punto fijo (set point), masa corporal, 931, 932f
punto isoeléctrico (pI), **84**
de aminoácidos, 84-85, 85f
de proteínas, determinación de, 94, 95f
purificación
de hormonas, 900-902, 901r, 902f
de proteínas, 89-90, 90f, 91f, 93t
etiquetas para, 331-333, 332f, 332t
inmunoprecipitación, 338-339, 338f, 339f
puromicina, **1103**, 1104f
PYY_{3-36}. *Véase* péptido YY

Q

Q-SNARE, 404, 404f
Q. *Véase* cociente de acción de masas
Q. *Véase* ubiquinona
QK. *Véase* filoquinona
qPCR. *Véase* PCR cuantitativa
queratán sulfatos, **261**, 261f
en agregados de proteoglucanos, 266-267, 267f
queratina, 76f
α-queratina, estructura y función de, 126-127, 126f, 127r
quilomicrones, 648f, **649**, 649f, 836
transporte de colesterol como, 836-837, 836f, 837t, 839f
quimiotaxis, en bacterias, 474, 475f
quimiotrofos, **5**, 5f
quimotripsina, 115f, **675**, 676-677
estructura de, 216f
inhibición de, 212f
mecanismo de, 216-220, 216f, 217f, 218f,-219f
zimógenos de, 232, 234f
quimotripsinógeno, 232-233, 234f, **675**, 676-677
composición de, 86-87, 87t, 88t
quinasa de receptor β-adrenérgico (BARK; GRK2), **448**, 448f, 449, 449f
quinasa Janus (JAK), **934**
en señalización por leptina, 933-934, 934f
quinasas de receptor acopladas a proteína G (GRK), **449**
quinasas, 506, 629r
quinesinas, 179
quinonas,
lipídicas, como cofactores de oxidación-reducción, 377f, 378
en centro de reacción, 758-759, 760f
quitina, **258**
estructuras y funciones de, 262t papel estructural de, 257-258, 258f

R

r-proteínas. *Véase* proteínas ribosómicas
R-SNARE, 404, 404f
R. *Véase* coeficiente de respuesta
RA. *Véase* ácido retinoico
Racker, Efraím, 727
radiación electromagnética, 754, 755f
radiación ionizante, daño causado al DNA por, 300
radical superóxido, **716**
producción en la cadena respiratoria mitocondrial de, 715, 722-723, 723f
radicales hidroxilo,
daño al DNA por, 300
producción por la cadena respiratoria mitocondrial de, 722-723, 723f
radicales, **502**, 502f. *Véase también* reacciones con radicales libres
daño al DNA por, 300
en el centro de reacción feofitina quinona, 759, 760, 761f
radio de van der Waals, **53**, 53t
radioinmunoensayo (RIA), **900**
Raf-1, en señalización por INSR, 462, 462f
Ramakrishnan, Venkatraman, 1082
ramnosa, 249, 249f
Ran-GDP, 1051f
Ran-GTP, 1109, 1110f
Ran, 1051f
RanGEF, 1109, 1110f
Ransome, Joseph, 458r
raquitismo, 375, 375f
Ras, 444r, **462**
en cáncer, **443r**
en señalización por INSR, 460-461, 462
isoprenilación postraducción de,1102, 1102f
oncogenes que codifican, 480, 481, 482r-483r
razón de control por aceptor, **787**
razón P/2e⁻, **783**
razón P/O, **783**
RBP1, 1034
RBP11, 1034
RBP2, 1034
RBP3, 1034
RE. *Véase* retículo endoplasmático
reacción de condensación, **69**, 69f. Véase también condensación de Claisen
formación de enlace peptídico por, 85-86, 86f
reacción de Fehling, 250r-251r, 251
reacción de Hill, **753**
reacción de primer orden, 160, 194
reacción de segundo orden, 1060, 194
reacción de transesterificación, 1041, 1041f, 1052
reacción en cadena de la polimerasa (PCR), **301**
adaptaciones de clonación de, 333, 333f, 334f
ampliación del DNA mediante, 301-303, 303f, 306r-307r
reacción vectorial, **714**
reacciones anapleróticas, **69**
intermediarios del ciclo del ácido cítrico a partir de, 634-635, 635f, 635t
reacciones bioquímicas, 501
cambios energéticos en. *Véase* bioenergética
ecuaciones para, 506-507
grupo fosforilo. *Véase* transferencia de grupos fosforilo
reordenamientos internos, isomerizaciones y eliminaciones, 503-504, 504f
principios básicos de, 502-503, 502f
reacciones de oxidación-reducción, 506, 506f, 517
cambio de energía libre de, 520-521, 521t
deficiencia de niacina y, 524, 525f
deshidrogenasas implicadas en, 522-523, 522f, 523f
deshidrogenación, 518-519, 518f
funciones del NAD^+ fuera de, 524
medias reacciones que describen, 517-518
NADH y NADPH en, 522-524, 522f, 523f, 525f
nucleótidos de flavina en, 524-525, 525f
oxidación de glucosa a CO_2, 521
potenciales de reducción para, 519-521, 519f, 521t
reacciones que forman o rompen enlaces carbono-carbono, 502-503, 503f, 504f
trabajo proporcionado por el flujo electrónico en, 517
transportadores electrónicos en, 522-523, 522f, 523f
reacciones de radicales libres, 504, 505f
reacciones de transferencia de grupo, 504-505, 505f
reacciones con radicales libres, 504, 505f
reacciones de asimilación de carbono, **752**, 752f
reacciones de eliminación, 503-504, 504f
cambios de energía libre estándar, 499t
reacciones de fijación de carbono, **752**, 752f
reacciones de isomerización, 503-504, 504f
reacciones de oxidación-reducción (redox), **23**
agua en, 69
biológicas, 506, 506f, 517
deficiencia de niacina y, 524, 525f
deshidrogenación, 518-519, 518f

deshidrogenasas implicadas en, 522-523, 522f, 523f
funciones del NAD^+ fuera de, 524
medias reacciones que describen, 517
NADN y NADPH en, 522-524, 522f, 523f, 525f
nucleótidos de flavina en, 524-525, 525f
oxidación de la glucosa a CO_2, 521
potenciales de reducción en, 519-521, 519f, 521t
trabajo producido por el flujo de electrones, 517
transportadores electrónicos en, 522-523, 522f, 523f
variación de energía libre de, 520-521, 521t
cofactores lipídicos involucrados en, 377-378, 377f
con moléculas de clorofila, 756, 759f
reacciones de transaminación, **677**
en el metabolismo de aminoácidos, 677, 677f, 678f, 679f
reacciones de transferencia de grupo, 504-506, 505f
grupo fosforilo. *Véase* transferencias de grupo fosforilo
reacciones dependientes de la luz, **752**, 752f
reacciones endergónicas, **23**, **496**
reacciones endotérmicas, **496**
reacciones exergónicas, **23**, **496**
reacciones exotérmicas, **496**
reacciones químicas
acoplamiento energético de, 24-25, 25f
agua en, 69, 69f
biológicas. Véase reacciones bioquímicas,
cambios de energía durante, 27-28, 27f, 192-193, 192f, 193f, 197, 197f
en sistemas biológicos. Véase bioenergética
catálisis enzimática de, 28-29, 27f, 28f, 189
ácido-base, 199, 199
cinética de. *Véase* cinética enzimática
covalente, 200
en el sitio activo, 192,-193, 192f
energía de fijación en, 196-199, 195f, 196f, 197f, 198f
especificidad de, 195-196, 195t, 197-199, 198f
ion metálico, 200
papel del estado de transición en, 196-197, 195f, 196f, 197f
principios de, 195-196, 195t
regulación de, 575-578, 576f, 576t, 577f, 578f, 578t
termodinámica de, 194-195, 194t, 500
velocidad de reacción y efectos de equilibrio durante, 192-194, 192f, 193f
de ácidos nucleicos
amplificación del DNA, 301,303, 303f, 306r-307r
desnaturalización, 295-298, 297f
metilación del DNA, 300-301
secuenciación del DNA, 303-311, 304f, 305f, 308f, 309f, 310f
síntesis química de DNA, 302f, 301
transformaciones no enzimáticas, 298-300, 298f, 299, 300f
de las células primitivas, 35-36, 36f
energía de activación de, 28, 193, 193f, 197, 197f
estado basal de, 192, 192f
estado de transición de, 27f, 28, 192f, 193, 193f
intermedios de, 193, 193f
Keq y ΔGo de, 25-27
paso limitante de velocidad de, 194
prebióticas, 1062, 1062f
regulación celular de, 29
termodinámica de. Véase termodinámica
velocidad de. Véase velocidades de reacción
reacciones químicas prebióticas, 1062, 1062f
reacciones redox. *Véase* reacciones de oxidación-reducción
reacciones. *Véase* reacciones químicas
reactivo de Hill, **754**
Reactivos
agua como, 69, 69f
concentración de, determinación de cambios reales de energía libre a partir de, 499-500
reactivos analíticos, anticuerpos como, 178, 179f
recambio, **576**
en la regulación metabólica, 575, 576f, 578t
receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso (TrkA), 464f
receptor de insulina (INSR)
cascada de fosforilación iniciada por, 460-463, 461f, 462f
interacciones en la señalización por, 464, 464f, 465f
papel de IP_3 en la señalización por, 463-464, 463f, 464f, 465f
receptor de leptina, **932**, 932f
receptor de transferrina, **626r**, 627r
receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, 464, 464f
receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), 464f, **482r**
inhibición de, para el tratamiento del cáncer, 482r-483r
receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), 464f
receptor HER2/neu, 482r-483r
receptor nicotínico de acetilcolina, **428**, 430
receptor X de farnesoide (FXR), 842
receptor X hepático, **841**, 842f
activación de, 844
receptores acoplados a proteína G (GPCR), 439, **440**, 440f
Ca^{2+} como segundo mensajero de, 450-451, 451t, 454f
Localización en de receptores β-adrenérgicos, 441-446, 441f, 445f, 446f, 442r-444r, 447f, 447t
otras moléculas reguladoras que utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
como dianas de fármacos, 441
defectos en, 440-441, 446r
diacilglicerol e IP_3 como segundos mensajeros de, 450-451, 451t, 454f
en la visión, 456-458, 456f, 457f, 458r
en olfato y gusto, 458
estructura de, 459-460, 460f
rasgos universales de, 458-460, 459t, 459f
receptores β-adrenérgicos,
cAMP como segundo mensajero de, 441-446, 441f, 442r-444r, 445f, 446f, 447f, 447t
como dianas de fármacos, 441
desensibilización de, 448-449, 448f, 449f
interacciones en la señalización por, 464, 465f
terminación de la respuesta por, 446-448
receptores adrenérgicos, **441**
receptores de acetilcolina, **428**, 430
partes membranosas de, 430
receptores de células T, **176**
receptores de la superficie celular, para hormonas, 902-903, 903f
receptores de LDL, **838**
captación de colesterol facilitadas por, 838-839, 840f
receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), **464**, 464f
oncogenes que codifican, 480-481, 481f, 482r-483r
receptores del factor de crecimiento,
oncogenes que codifican, 480, 481f, 482r-484r
señalización de RTK por, 464, 464f, 465f
receptores del peroxisoma activados por proliferador (PPAR), **662**, **937**
en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos, 662
regulación de la masa corporal por, 937-937, 938f
receptores heptahelicoidales, 441
receptores ionotrópicos, **472**, **902**, 903f
receptores metabotrópicos, **472**, **902**, 903f
receptores nucleares, 439, 440f
para hormonas, 902-903, 903f
regulación de la transcripción por, 472-474, 473f
receptores retinoides X (RXR), **842**, 842f
receptores β-adrenérgicos, **441**
cAMP como segundo mensajero de, 441-448, 441f, 447t
como dianas de medicamentos, 440
desensibilización de, 448-449, 448f, 449f
finalización de la respuesta por, 446-448
interacciones en la señalización por, 464, 465f
reciclado de ribosomas, 1098, 1099f
recombinación del DNA
en bacterias, 1008-1010, 1008f, 1009f, 1010f, 1011f
en eucariotas, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1015f
en la reparación del DNA, 1008-1010, 1008f
específica de sitio, 1005, 1016-1018, 1017f, 1018f
funciones de, 1006-1007
génica homóloga, 1005-1015
bacteriana, 1008-1009, 1008f, 1009f, 1010f, 1011f
durante la meiosis, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1016f
funciones de, 1005-1007, 1012
inicio por rotura de doble cadena de, 1012-1015
migración de rama en, 1009-1010, 1009f, 1011f
modelo de reparación de rotura de doble hebra para, 1012-1015
transposición, 1005
unión de extremos no homólogos, 1015-1016, 1016f
recombinación específica de sitio, **1005**, 1016-1018, 1017f, 1018f *Véase también* recombinación del DNA
recombinación genética homóloga, **1005**. *Véase* también recombinación del DNA, funciones de, 1008-1010, 1012
durante la meiosis, 1011-1012, 1012f, 1013f, 1015f
inicio por corte de doble hebra para, 1012-1015
específica de sitio, 1005, 1016-1018, 1017f, 1018f
recombinación genética. Véase también, recombinación del DNA
específica de sitio, 1005, 1016-1018, 1017f, 1018f
funciones de, 1008-1009
homóloga, 1005-1015
regulación génica por, 1138, 1138f, 1139t
recombinación, regulación génica mediante, 1138, 1138f, 1139t
recombinasa Hin, 1138, 1138f, 1139t
recombinasa, 1016
recuperación de la fluorescencia después de fotodecoloración (FRAP), **400**
estudios de difusión de lípidos mediante, 400, 400f
reducción de la entropías, **198**
por los enzimas, 198, 198f
reducción, de dobles enlaces para la síntesis de ácidos grasos, 809f, 810
región tamponante, **64**
regiones hidrofóbicas de, 393-394, 393f, 394f
topología de, 392-393, 393f
predicción de la secuencia de aminoácidos de, 394-395, 395f, 396f
regla del positivo en el interior, **395**
regulación alostérica
de biosíntesis de pirimidinas, 885-886, 887f
de la acetil-CoA carboxilasa, 812-814, 813f
de la biosíntesis de aminoácidos, 873-875, 875f
de la carbamil fosfato sintetasa I, 684-685, 685f
de la glucógeno fosforilasa, 604-607, 605f, 606f
de la glucólisis, 545 de la glutamina sintetasa, 861, 861f
de PFK-1 y FBPasa-1
por ATP, ADP, AMP y citrato, 590-591, 590f
por fructosa 2,6-bisfosfato, 591, 591f
de piruvato quinasa, 592-593, 593f
de proteína quinasas, 44, 446f
de ribonucleótido reductasa, 889-890, 890f
del complejo de la PDH, 637-638, 638f
del metabolismo global de glúcidos, 609-611, 610f, 611f
en la regulación metabólica, 574-575, 576f, 578f, 578t
integración del metabolismo de glúcidos y lípidos por, 611
regulación de la masa corporal
efectos de la adiponectina en, 935, 935f
efectos de la dieta solbre, 937-938, 938f
efectos de la insulina en, 934
efectos de la leptina en, 933-934, 933f, 934f
efectos microbianos del intestino sobre, 940, 940f
funciones endocrinas del tejido adiposo, 931-933, 932f
grelina, PYY_{3-36} y efectos de los canabinoides en, 938-939, 939f
papel de AMPK en, 935-936, 935f, 936f, 937f
ruta mTORC1 en, 936-937, 937f
regulación del ciclo celular
apoptosis, 484-486, 486f
pérdida de,
papel de los oncogenes en, 480, 481, 481f, 482r-483r
papel del gen supresor de tumores, 481-484, 485f
por proteína quinasas, 475-476
fosforilación de proteínas en, 479-480, 479f
niveles oscilantes de CDK, 477-479, 476f, 477f, 478f, 479f
regulación génica, 1119, 1120f
en bacterias,
atenuación de la transcripción de genes por enzimas de la biosíntesis de aminoácidos, 1131-1134, 1132f, 1133f

COPYRIGHT

coordinación de la síntesis de r-proteínas y rRNA, 1135-1136, 1135*f*, 1136*f*
inducción de la respuesta SOS, 1134, 1134*f*
recombinación genética, 1138-1139, 1138*f*, 1139*t*
regulación por sRNA de los mRNA, 1136-1138, 1136*f*, 1137*f*
regulación positiva del operón *lac*, 1130-1131, 1131*f*
en eucariotas, 1139
activadores y coactivadores de unión al DNA en el ensamblaje del factor de transcripción basal, 1142-1144, 1142*f*, 1145*f*
control del desarrollo vía cascadas de proteínas reguladoras, 1151-1157, 1152*f*, 1153*f*, 1155*f*, 1156*f*
estructura de la cromatina transcripcionalmente activa, 1140-1141, 1141*t*
estructura modular de los activadores de la transcripción, 1145, 1147*f*
formas de regulación con intervención de RNA, 1151
fosforilación de los factores de la transcripción nuclear, 1148-1149
potencial de desarrollo por células madre, 1157-1160, 1157, 1160*f*
regulación positiva de protónteros, 1141-1142, 1142*f*
regulación positiva y negativa de los genes del metabolismo de la galactosa en levadura, 1145, 1146*f*, 1147*t*
represión en la traducción de mRNA, 1149-1150, 1150*f*
señales intercelulares e intracelulares, 1146-1148, 1148*f*, 1149*f*, 1149*t*
silenciado de la postranscripción génica por interferencia del RNA, 1150-1151, 1151*f*
en la evolución humana, 349
en la evolución, 1158r-1159r, 1160 por receptores hormonales nucleares, 472-474, 473*f*
principios de
dominios de interacción proteína-proteína de proteínas reguladoras, 1128-1130, 1129*f*
dominios de unión al DNA de proteínas reguladoras,
operones, 1123-1125, 1123*f*, 1124*f*
promotores, 1120-1121, 1120*f*
regulación del inicio de la transcripción, 1121-1123, 1121*f*, 1122*f*
regulación hormonal, 935, 935*f*, 936*f*
de la glucogenólisis y glucogénesis, 603-607, 605*f*, 606*f*
de la glucólisis y la gluconeogénesis, 594-598, 594*f*, 595*t*, 596*f*, 597*r*
de la masa corporal
efectos de la adiponectina sobre, 935, 935*f*, 936*f*
efectos de la dieta sobre, 937-938, 937*f*, 938*f*
efectos de la insulina sobre, 943
efectos de la leptina en, 933-934, 933*f*, 934*f*
efectos microbianos intestinales sobre, 940, 940*f*
funciones endocrinas del tejido adiposo, 931-933, 932*f*
grelina, PYY_{3-36} y efectos de los cannabinoides en, 938-939, 939*f*
papel de la AMPK en, 935-936, 935*f*, 936*f*, 937*f*
ruta mTORC1 en, 936-937, 937*f*, 936*f*
de la síntesis de triacilgliceroles, 821-823, 822*f*
de los hábitos alimentarios, 908-909, 909*f*, 910*t*
del metabolismo energético, 922-923
adrenalina en, 929, 929*t*
cortisol en, 930
diabetes mellitus y, 930-931
durante el ayuno y la inanición, 927-929, 927*t*, 928*f*, 929*f*
efectos de la insulina en, 923, 923*t*, 924*f*
efectos del glucagón en, 925-926, 926*t*, 927*f*
secreción de insulina por las células pancreáticas en, 923-925, 924*f*, 925*f*, 926*f*
del metabolismo glucídico global, 609-611, 610*f*, 611*f*
en diabetes mellitus tipo 2
resistencia a la insulina en, 941, 942*f*
tratamiento de, 942-943, 943*t*, 944*f*
integración de los metabolismos glucídico y lipídico por, 611
metabolismo específico de tejido y, 909, 911*f*
tejidos adiposos, 914-916, 915*f*, 916*f*
sangre, 921-922, 921*f*, 922*f*
cerebro, 920-921, 920*f*
hígado, 910-914, 913*t*, 913*f*, 914*f*
músculo, 916-920, 917*f*, 918*f*, 918*r*-919*r*, 920*f*
regulación metabólica, 493-494, 573-574, 574*f*, **578**
biosíntesis de nucleótidos, 885-887, 885*f*, 887*f*
coordinación de glucólisis y gluconeogénesis, 587, 587*f*
ATP en la inhibición alostérica de la piruvato quinasa, **592**-593, 593*f*
conversión del piruvato en fosfoenolpirurvato, 593-594, 593*f*, 594*f*
fructosa 2,6-bisfosfato en la regulación alostérica de PFK-1 y FBPasa-1, 591-592, 591*f*, 592*f*
regulación recíproca de fosfofructoquinasa-1 y fructosa 1,6-bisfosfatasa, 590-591, 590*f*
regulación transcripcional de hexoquinasa y glucosa 6-fosfatasa, 589-590
regulación transcripcional del número de moléculas de enzima, 594-598, 595*t*, 594*f*, 596*f*, 597*r*
respuestas de los isozimas de las hexoquinasas a la glucosa 6-fosfato, 588-589, 588*r*, 589*f*
xilulosa 6-fosfato como regulador clave en, 592-594, 593*f*
coordinación de la glucogenólisis y la glucogénesis,
fosforilación y desfosforilación de la glucógeno sintasa, 607-608, 608*f*
mediación por GSK3 de la insulina, 608-609, 609*f*
papel del PP1 en, 609, 610*f*
regulación alostérica y hormonal de la glucógeno fosforilasa, 603-607, 605*f*, 606*f*
señales alostéricas y hormonales en el metabolismo glucídico global, 609-611, 610*f*, 611*f*
coordinación por AMPK de catabolismo y anabolismo, 935-936, 935*f*, 936*f*, 937*f*
de la biosíntesis de aminoácidos, 873, 875*f*
de la fosforilación oxidativa
inhibición de la hidrólisis de ATP inducida por la hipoxia, 737, 738*f*
por las necesidades energéticas celulares, 737
regulación coordinada de las rutas productoras de ATP, 738*f*
respuestas adaptativas que reducen la producción de ROS en la hipoxia, 737-739, 738*f*
de la oxidación de ácidos grasos, 659, 659*f*, 662
proteínas reguladoras de factores de transcripción del catabolismo lipídico, 662
de la síntesis de ácidos grasos, 812-814, 813*f*
del ciclo de la urea, 684-685, 685*f*
del ciclo del ácido cítrico
canalización de sustratos, 639, 639*f*
defectos en, 639-640, 639*f*
en los pasos exergónicos, 638-639
regulación alostérica y covalente del complejo PDH, 637-638, 638*f*
del metabolismo energético, 922
adrenalina en, 929, 929*t*
cortisol en, 930
diabetes mellitus y, 930-931
durante el ayuno y la inanición, 927-929, 927*t*, 928*f*, 929*f*
efectos de la insulina en, 923, 924*f*, 923*t*
efectos del glucagón en, 925-926, 927*f*, 926*t*
secreción de insulina por las células β pancreáticas en, 923-925, 925*f*, 926*f*
equilibrios de reacción y, 578-580, 579*f*, 579*t*
estudios de. *Véase* análisis del control metabólico
hormonal. *Véase* regulación hormonal
integración de los metabolismos glucídico y lipídico, 611
mantenimiento del estado estacionario en células y organismos, 575
nucleótidos de adenina en, 582-584, 582*f*, 583*f*, 583*t*
papel del sistema neuroendocrino en, 899, 900*f*
regulación de, 29
regulación enzimática en, 575-578, 576*f*, 576*t*, 577*f*, 578*f*, 578*t*
regulación global del metabolismo glucídico, 609-611, 610*f*, 611*f*
rutas de la respiración celular, 739, 739*f*
regulación negativa, **1122**, 1122*f*
de los genes del metabolismo de la galactosa en levadura, 1145, 1146*f*, 1147*t*
del operón *lac*, 1124-1125, 1124*f*
regulación positiva, **1122**, 1122*f*
de los genes del metabolismo de la galactosa en levadura, 1145,1146, 1147*t*
de promotores eucarióticos, 1141-1142, 1142*f*
el operón *lac*, 1130-1131, 1131*f*
regulación transcripcional
de la glucólisis y la gluconeogénesis, cambios globales en, 594-598, 594*f*, 595*t*, 596*f*, 597*r*
de la hexoquinasa IV y la glucosa 6-fosfatasa, 589-590
de la HMG-CoA reductasa, 842-843,841*f*, 842*f*
de la oxidación de ácidos grasos, 662
regulador de respuesta, **474**
en la señalización bacteriana, 474, 474*f*
reguladores arquitecturales, **1123**, **1142**, 1143, 1143*f*
reguladores de la señalización por proteínas G (RGS), **443***r*
regulón, **1131**
reinicio de la replicación independiente de origen, **1010**
Relenza. *Véase* zanamivir
remodelado de la cromatina, **1140**, 1141, 1141*t*, **1142**, **1143***f*
renaturalización
de proteínas, 144, 144*f* del DNA, 295-298, 297*f*
reordenamientos, 503-504, 504*f*
cambios de energía libre estándar de, 499*t*
reparación de apareamientos incorrectos, 998*t*, 998-999, 998*f*, 999*f*, 1000*f*
reparación del DNA, 31, 31*f*
apareamiento incorrecto, 985, 998*t*, 998-1000, 998*f*, 999*f*, 1000*f*
cáncer y, 1007*r*-1008*r*
corrección de pruebas en, 985, 986*f*
directa, 998*t*, 1002-1003, 1003*f*, 1004*f*
DNA fotoliasas en, 998*t*, 1003*f*, 1002-1003
en bacterias, 998*t*
excisión de base, 998*t*, 1000-1001, 1001*f*
excisión de nucleótido, 998*t*, 1001-1002, 1002*f*, 1007*r*-1008*r*
O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa en, 1002, 1004*f*
recombinación en, 1008-1009, 1008*f*
recombinatorio, 1008-1009
respuesta SOS en, 1004
traslado de mella en, 987, 986*f*, 993
reparación por excisión de base, 998*t*, 1000-1001, 1001*f*
reparación por excisión de nucleótido, 998*t*, 1007*r*-1008*r*
en bacterias, 998*t*, 1001-1002, 1002*f*
reparación recombinacional de DNA, **1008**, 1008*f*, 1009
reparación, del DNA, 31, 31*f*
repelentes de agua, ceras como, 363-364, 364*f*
repeticiones de secuencia sencillas (SSR), **346**, **956**
en el genoma humano, 346, 346*f*
repeticiones en tándem cortas (STR), **306***r*
en el genoma humano, 346
en genotipado del DNA, 306*r*-307*r*
repeticiones especulares, en el DNA, 291*f*, 292-293
repeticiones invertidas, **291**
en el DNA, 290*f*, 291-293, 291*f*
replicación del DNA, 31, 31*f*
eplisomas en, 987, 993
secuencia Ter en, 993, 994*f*
secuencia Tus-Ter en, 993, 994*f*
semiconservadora, 981
síntesis de hebras en, 983, 983*f*
superenrollamiento en, 957, 958*f*
terminación de, 993-994, 995*f*
topoisomerasas en, 987
transcripción comparada con, 1028
translesión propensa al error, 1003-1005, 1006*f*, 1006*t*, 1007*r*-1008*r*
transposición en, 1018-1020, 1019*f*
traslado de mella en, 987, 986*f*
replicación semi-conservadora del DNA, **981**
replicación, 949
del DNA, 31, 31*f*
superenrollamiento del DNA y, 957, 958*f*
replicadores, **994**
replisoma, **987**, 992*t*
repolarización, de neuronas, 471, 472*f*
representación de Hill, **167**
de la unión de oxígeno a la mioglobina y a la hemoglobina, 167, 167*f*
represión de la traducción, de los mRNA, 1149-1150, 1150*f*

SOLUCIONARIO

represión por catabolito, **1130**, 1131, 1131f
represión, **1120**
de la traducción, 1149-1150, 1150f
por catabolito, 1130-1131, 1131f
represor controlado por hemina I(HCR), **1150**
represor de la traducción, **1135**, 1136f
represor LexA, en la inducción de la respuesta SOS, 1134, 1134f
represores, **1031**, **1121**, 1122-1123, 1122f
de la traducción, 1135, 1135f
del operón *lac*, 1124
en la inducción de la respuesta SOS, 1134, 1134f
reprimibles, 1120
rescate de ribosomas, 1099, 1101f
residuo amino-terminal (*N*-terminal), **86**
residuo C-terminal. *Véase* residuo carboxilo terminal
residuo carboxilo terminal (C terminal), **86**
residuo *N*-terminal. *Véase* residuo amino-terminal
residuos aminoácidos, **75**
modificados, 1100-1103, 1102f
residuos Gla. *Véase* γ-carboxiglutamato
residuos γ-carboxiglutamato (Gla), **81**, 82s, **236**, 1110f
resistencia a la insulina,
en diabetes mellitus tipo 2, 941-942, 942f papel de SCD en, 815
resistencia a la mutación del, 1077
resolvinas, 820
respiración celular, **617**
fases de, 617, 618f
fosforilación oxidativa. Véase fosforilación oxidativa
oxidación de acetil-CoA. Véase ciclo del ácido cítrico
producción de acetil-CoA, 617
canalización de sustratos en el complejo PDH, 620-621, 621f
coenzimas del complejo PDH, 619, 619f, 620f
enzimas del complejo PDH, 619-620, 620f
reacción de descarboxilación oxidativa, 618-619, 619f
regulación coordinada de las rutas productoras de ATP en, 739-740, 739f
rendimiento de ATP en, 737, 737t
respiración mitocondrial, **786**
respiración, **617**, 618f, 495. *Véase también* visiones iniciales de la respiración celular
respirasomas, **719**, 719f, 720r-721r
respuesta alérgica, papel de IgE en, **891**, 892f
respuesta de proteína desplegada (UPR), 148-149
respuesta inflamatoria,
papel de los ácidos grasos trans en, 363, 363f
papel de los icosanoides en, 819-820
selectinas en, 270-271, 271f
respuesta inmune, **174**
células y proteínas que intervienen en, 174-176, 175t
evasión de *Salmonella typhimurium*, 1138, 1138f, 1139t
respuesta luchar o huir
metabolismo energético durante, 929t, 931
metabolismo glucídico global durante, 609-611, 610f, 611f
respuesta severa, **1135**, 1136
respuesta SOS, **1004**
inducción de, 1134, 1134f
retículo endoplasmático (RE), **7**, 8f
enzimas P-450 del, 740
modificación postraducción en, 1105-1106, 1106f
ribosomas en, 1070, 1070f
síntesis de membranas en, 390, 391, 829
ω-oxidación en, 663-664, 665f
retículo sarcoplásmico, 181f, **182**
Retin-A. *Véase* tretinoína
retinal, 375-377, 376f, 377f
retraso del crecimiento, deficiencia de vitamina A como causa, 377
retrohoming, 1058, 1060
retroinhibición secuencial, **673**, **885**
retrotransposones, 1057-1058, 1058f
retrovirus, **220**, **1055**
cáncer y SIDA causados por, 1057, 1058f, 1059r
similitudes entre transposones e intrones con, 1057-1058, 1058f, 1060f
transcriptasas inversas en, 1055, 1056f, 1057f
Rezulin. *Véase* troglitazone
RFC. *Véase* factor de replicaciónC
RGS. *Véase* reguladores de la señalización por proteína G
RIA. *Véase* radioinmunoensayo
ribointerruptores, **1137**, 1137f
ribonucleasa A, desnaturalización y renaturalización de, 144, 144f
ribonucleasas
casquete 5' y, 1040, 1040f
degradación de RNA mensajero por, 1053-1054
en el procesamiento del RNA ribosómico, 1049, 1049f, 1050f
ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP), 1042-1043
ribonucleósidos 2',3' monofosfato cíclico, **284**, 284s
ribonucleósidos 3'-monofosfato, **284**, 284s
ribonucleótido reductasa, **887**, 888f, 888-889, 889f, 890f
ribonucleótidos, **283**, 283s
síntesis de desoxirribonucleótidos a partir de, 887-890, 888f, 889f, 890f
ribosa 5-fosfato,
a partir de la ruta de las pentosas fosfato, 564f, 565, 566r
biosíntesis de histidina a partir de, 871-875, 874f
en el ciclo de Calvin, 779, 781f, 782f
ribosa fosfato pirofosfoquinasa, **864**
ribosa, 244, 244s en el RNA, 282-283, 283f
ribosomas, **3**
catálisis por, 1062-1064, 1081-1082
corrección de pruebas sobre, 1097
descubrimiento de, 1070, 1070f
estructura de, 293-295, 293f, 294f, 296f, 1081-1083, 1082t, 1083f
mitocondriales, 741-742
síntesis de proteínas por. *Véase* síntesis de proteínas
síntesis de, coordinación de la síntesis de proteínas ribosómicas con, 1135-1136, 1135f, 1136f
sitios de unión de tRNA sobre, 1089-1093, 1093f
ribotimidina, 1048f
ribozima en cabeza de martillo, 1051, 1052f
ribozimas, 295, 296f, **1039**, 1063r. *Véase también* intrones de autocorte y empalme
clases de, 1061
descubrimiento de, 1027, 1039, 1051
en cabeza de martillo, 1051, 1052
[illegible]
replicación antes de la división, 1064f, 1065
ribosomas como, 1064, 1082
rubulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco), **777**. *Véase también* rubisco
activación de, 784-785, 785f
actividad carboxilasa de, 777, 778f catálisis por
con CO_2 como sustrato, 776f, 777-778
con O_2 como sustrato, 786-787, 786f
en la fotorrespiración, 786-787, 786f
en plantas C_3, 789
en plantas C_4, 788-791, 791f
en plantas CAM, 791-792
estructura de, 776f, 777-778
evolución de, 787
lisina y, 777, 779f
magnesio en, 776f, 777
modificada genéticamente, 788, 789r
ribulosa 1,5-bisfosfato, **777**, 779
en el ciclo de Calvin, 779-781, 783f, 784f
incorporación de oxígeno en, 786-787, 786f
regeneración a partir de triosas fosfato, 779, 781f, 782f, 783f
ribulosa 5-fosfato quinasa, activación por la luz de, 785, 785f
ribulosa 5-fosfato,
en el ciclo de Calvin, 779, 781f, 782f, 783f
en la ruta de las pentosas fosfato, 564f, 565
ribulosa, 248s
Richardson, Jane, 137
ricina, **1104**
rifampicina, **1036**
Rinaldo, Piero, 700r-701r
riñón, acuaporinas en, 411r, 423
RK. *Véase* rodopsina quinasa
RNA 1 de shock calórico, 1151
RNA activador del receptor de esteroides (SRA), **1148**
RNA como primer, 34-35, 36f
RNA de interferencia (RNAi), **1150**
silenciado postraducción de genes por, 1150-1151, 1151f
RNA de interferencia pequeños (siRNA), **1150**, 1151f
RNA de transferencia (tRNA), **261**, **1027**
activación de aminoácidos por, 1080
anticodones en. *Véase* anticodones
descubrimiento de, 1070, 1070f
estructura de, 293-295, 293f, 294f, 1083-1084, 1084f, 1085f
expansión del código genético y, 1090r-1091r
procesado de,1049-1050, 1050f
reconocimiento del codón por, 1076-1077, 1076f, 1077t
síntesis de, 1047, 1048f
síntesis por RNA polimerasa III de, 1034
sitios de unión en el ribosoma para, 1089-1093, 1093f
supresores, 1100r
transcrito primario de, 1041
unión de aminoácidos a, 1083-1084, 1085t, 1086f, 1090r-1092r
interacciones de las aminoacil-tRNA sintetasas con, 1087-1088, 1087f, 1088f, 1089
unión del codón a, 1072, 1072t
RNA de transferencia-mensajero (tmRNA), 1099, 1101f
RNA guías (gRNA), **842**
RNA largos, no-codificantes (lncRNA), **1121**, 1148, 1151
RNA M1, 1052
RNA mensajeros, (mRNA), **281**, **1027**
casquete 5' de, 1040-1041, 1040f
codones en. *Véase* codones
corte y empalme alternativo de, 1046-1047, 1046f, 1047f
edición de, 1077-1079, 1077f, 1078f, 1079f
en microchips de DNA, 340-341, 341f, 342f
en regulación metabólica, 576, 576f
estructura de, 291-293, 293f
extremo 3' de, 1045, 1045f, 1046f
materno, **1152**
moldes artificiales de, descifrado del código genético mediante, 1070-1073, 1071f, 1072t, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
polipéptido codificado por, 293-295, 293f, 294f
procesamiento de, 1046f
regulación por sRNA de, 1136-1138, 1136f, 1137f
represión traduccional de, 1149-1150, 1150f
secuencia Shine-Dalgarno en, 1089-1094, 1093f, 1094f
síntesis por RNA polimerasa II de, 1034
transcrito primario de, 1039-1040, 1040f
velocidad de degradación de, 1063
RNA no codificantes (ncRNA), **1151**
RNA nucleares pequeños (snRNA), **1042**, 1050
RNA nucleolares pequeños (snoRNA), **1048**, 1050f, 1050-1051
RNA pequeño (sRNA), regulación del mRNA por, 1136-1138, 1136f, 1137f
RNA pequeño temporal (stRNA), **1150**
RNA polimerasa
corrección de pruebas por, 1030
dependiente de DNA, 1028, 1028f, 1029
inhibición selectiva de, 1038, 1039f
en la transcripción,
en bacterias, 1028-1030, 1028f, 1030f, 1033f
en eucariotas, 1034, 1035f
inicio de, 1029, 1033f
estructura de, 1030, 1030f
footprinting de, 1032r
holoenzima, 1030, 1030f
promotores y, 1030
regulación de, 1031, 1033f
por promotores, 1120-1121, 1120f
por proteínas y RNA, 1121-1123, 1121f, 1122f
RNA polimerasa dependiente de DNA, **1028**, 1028f, 1029
inhibición selectiva de, 1038, 1039f
RNA polimerasa I (Pol), 1034
RNA polimerasa II (PolI), 1034
casquete 5' y, 1040-1041
factores proteicos de, 1034-1038, 1036t, 1037f
función de, 1034
intrones espliceosómicos y, 1043, 1044f
promotores de, 1142-1145, 1143f, 1145f
promotores y, 1034, 1035f
regulación de, 1038
subunidades de, 1034-1035
transcripción por, 1036-1038, 1037f
RNA polimerasa III (PolII), 1034
RNA polimerasas dependientes de RNA (RNA replicasas), **1061**
RNA prerribosómicos (pre-RNA), 1034, 1047
procesamiento de, 1047-1049, 1048f, 1049f

RNA replicasa. *Véase* RNA polimerasas dependientes de RNA
RNA ribosómicos (rRNA), **281**, **1027**
estructura de, 293-295, 293f, 294f, 296f
procesamiento de, 1048-1049, 1048f, 1049f, 1050f
en bacterias, 1048, 1048f
en eucariotas, 1047-1049, 1049f, 1050f
síntesis de, 1048, 1048f
RNA trans activador de CRISPR, **342**, 342f, 343
RNA. Véase ácido ribonucleico
RNAi. *Véase* RNA de interferencia
RNasa D, 1049, 1050f
RNasa P, 294f, 1049, 1050f, 1052
Roberts, Richard, 1041
Rodbell, Martin, 442r
Roderick, Thomas H., 319
rodopsina quinasa (RK), 456f, 457, 458
rodopsina, 376, **456**
actividad escramblasa de, 399
en la señalización de la visión, 456-458, 456f, 457f, 458r
rofecoxib (Vioxx), 819
ROS. *Véase* especies de oxígeno reactivas
roscovatina, 484r
rosetas, en celulosa, 796, 797f
rosiglitazona (Avandia), 943t
Ross, Inman, 982
rotenona, 715, 715t
Rothman, James E., 404
rotura heterolítica, **502**, 502f
rotura homolítica, **502**, 502f
RPA. *Véase* proteína de replicación A
RRM. *Véase* motivos de reconocimiento del RNA
rRNA. *Véase* RNA ribosómicos
RSS. *Véase* secuencias señal de recombinación
RT-PCR. *Véase* PCR con transcriptasa inversa
RTK. *Véase* tirosina quinasas de receptor
RTT106, 969
RU486. *Véase* mifepristona
rubisco activasa, **777**, 779f
rubisco. *Véase* ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
rut. *Véase* utilización de rho
ruta C_4, **789**
ruta de las hexosas monofosfato, **565**. *Véase también* ruta de las pentosas fosfato,
ruta de las pentosas fosfato, 533-534, 533f, **567**, 564f, **777**
defectos en, 566r, 568
distribución de la glucosa 6-fosfato entre glucólisis y, 568, 568f
en el hígado, 912, 913f
fase no oxidativa de, 565-568, 567f, 568f, 777
fase oxidativa de, 565-567, 564f, 568, 799
ruta del fosfogluconato, **564**, *Véase también* ruta de las pentosas fosfato
ruta del glicolato en, **787**, 787f, 788, 790f
ruta exógena, **837**
del transporte del colesterol, 837, 839f
ruta intrínseca, **235**
en la coagulación de la sangre, 235, 235f
ruta oxidativa de las pentosas fosfato, 564-565, 564f, **567**, 799
ruta reductora de las pentosas fosfato, 565-567, 565f, 567f, **568**, 777
rutas de la información, 949-950
rutas de novo, 882
de la biosíntesis de nucleótidos, 882-883
pirimidinas, 885-886, 886f, 887f
purinas, 883-885, 883f, 884f, 885f
rutas del esqueleto carbonado, 687-688
cofactores enzimáticos implicados en, 688-691, 689f, 690f, 691f
conversión a glucosa o cuerpos cetónicos, 688, 688f
conversión a succinil-CoA, 688f, 698-700, 698f, 700r-701r
conversión a α-cetoglutarato, 688f, 698, 698f
defectos en, 692-698, 694t, 697f, 700r-701r
degradación a acetoacetil-CoA, 688f, 694, 695f, 696f
degradación a oxalacetato, 688f, 701f, 702
degradación a piruvato, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
degradación de aminoácidos de cadena ramificada, 688f, 699f, 700-701
rutas endógenas, **838**
de transporte del colesterol, 839, 839f
rutas metabólicas convergentes, 493, 493f
rutas metabólicas divergentes, 492, 493f
rutas metabólicas, 28-29, 492, 493-494, 493f, 494f. *Véase también* rutas específicas 28-29, **492**, 493-494, 493f
coordinación por AMPK de, 935-936, 935f, 936f, 937f
flujo a través de. *Véase* flujo
paso limitante de velocidad, 582
red multidimensional de, 573, 574f
RuvAB, 1010, 1011f
RuvC, 1010, 1011f
RXR. *Véase* receptores retinoides X
RYGBP. *Véase* cirugía bariátrica

S

S-adenosilhomocisteína, **689**, 691f
S-adenosilmetionina (adoMet), **689**
como agente alquilante, 300, 300f
en la degradación de aminoácidos, 688-691, 689f, 691f
S. Véase entropía
SAA. *Véase* amiloide A sérico
sabores
detección de, señalización por GPCR en, 458
dulce, 254r-255r
sacarosa 6-fosfato fosfatasa, **793**, 793f
sacarosa 6-fosfato sintasa, **793**, 793f
sacarosa 6-fosfato, **793**, 793f
sacarosa, 243, 253, 253f, 793s
ciclo de Calvin y, 783
en la fotosíntesis, 793-794, 793f, 794f
en semillas en germinación, 794-796, 795f
sabor dulce de, 254r-255r
Saccharomyces cerevisiae, 326
expresión de proteínas recombinantes en, 329
fermentación etanólica en, 553, 553f
intrones en, 1041
Sakmann, Bert, 426
Salmonella typhimurium
lipopolisacáridos de, 269, 269f
regulación por recombinación genética en, 1138, 1138f, 1139t
saltantes, 1005-1007
salto de protones, en el agua, 58, 59f
Samuelsson, Bengt, 373
Sancar, Aziz, 1021
Sanger, Frederick, 97, 98f, 302
sangre
composición de, 921, 921f
funciones metabólicas de, 921-922, 921f, 922f
tamponamiento de, 66-67, 66f
transporte de amoníaco en, 678, 680f
transporte de oxígeno en, 163
sarcómero, 181f, **182**
saxitoxina, 430
SCAD. *Véase* acil-CoA de cadena corta deshidrogenasa
SCAP. *Véase* proteína activadora de la rotura de SREBP
SCD. *Véase* estearil-ACP desaturasa
Schally, Andrew, 900
Schekman, Randy W., 404
Schultz, Peter, 1090r
SCOP2. *Véase* base de datos de la Structural Classification of Proteins
SDS. *Véase* dodecil sulfato sódico
SecA, 1109, 1110f, 1111f
SecB, 1109, 1110f, 1111f
secretina, **675**
secuencia C/D snoRNP, 149, 1050f
secuencia de inserción, **1018**
secuencia de localización nuclear (NLS), **1109**, **1110f**
secuencia GATC, en reparación de apareamientos incorrectos, 998-1000, 998f, 999f
secuencia guía interna, **1052**
secuencia H/ACA snoRNO, 149, 1050f
secuencia Shine-Dalgarno, 1089, 1093, 1093f, 1094f
secuencia TATA, 1034, 1035f, 1142-1144, 1143f, 1145f
secuencia TATAAT, 1030, 1031f
secuencia Ter, 993, 994f
secuencia TTGACA, 1030, 1031f
secuencia Tus-Ter, 993, 994f, 995f
secuenciación **454**, 308-309, 308f
secuenciación automatizada de DNA, 305, 305f
secuenciación con terminador reversible, **309**, 309f, 310
secuenciación de proteínas directa, 97, 98f
secuenciación
de proteínas, 97, 97f
métodos clásicos de, 97-99, 98f, 99f, 100f, 100t
métodos de espectrometría de masas para, 100-102, 101f, 102f
del DNA
método de Sanger para, 303-305, 304f, 305f
tecnologías para, 305-311, 308f, 309f, 310f
del genoma humano, historia evolutiva obtenida del, 351-353, 352f, 353r-354r
genoma humano
comparaciones con los parientes biológicos más próximos, 347-349, 348f, 349f, 350f
historia de, 343, 345f
localización de genes de enfermedades en, 349-351, 351f
medicina personalizada que utiliza, 344r
tipos de secuencias vistos en, 345-347, 346f, 347f
genomas completados, 37-39, 38t, 343, 345f
secuenciación de Sanger, 303, 304f, 306, 305f
secuenciación de siguiente generación, 305-311, 308f, 309f, 310f
secuenciación en tiempo real de moléculas individuales (SMRT), **311**
secuenciación por semiconductor iónico, **311**
secuenciación por terminación de cadena con didesoxi, (*Véase* secuencia Sanger)
secuenciación profunda, **311**
secuenciación profunda, **311**
secuenciación SMRT. *Véase* secuenciación de molécula única en tiempo real
secuencias activadoras del lado 5' (UAS), **1142**, 1143f
secuencias altamente repetitivas, **956**
secuencias consenso, **104**, 105r, **445**
de proteína quinasas, 232, 233t
de sustratos proteicos de la PKA, 445, 447t
de sustratos proteicos de la PKC, 451
en transcripción, 1030, 1031f
secuencias CpG, metilación de, 301
secuencias de aminoácidos
comparaciones de, 335-336, 335f de hemoglobina y mioglobina, 163-164, 164f
de proteínas integrales de membrana, predicciones topológicas basadas en, 394-396, 395f, 396f
de una hélice α, 122-123, 122f, 122t
determinación de, 97, 97f
espectrometría de masas, 100-101, 101f, 102f
métodos basados en conceptos clásicos, 97-99, 98f, 99f, 100f, 100t
estructura terciaria y, 144, 144f
función proteica y, 96
información bioquímica a partir de, 103-104, 105r
información histórica a partir de, 104-107, 106f, 107f, 108f
mutagénesis dirigida de, 330-331, 331f
relación entre secuencia de nucleótidos y, 281
secuencia codificante de nucleótidos correlacionada con, 951-952, 952f
secuencias de replicación autónoma (ARS), 994
secuencias firma, **107**, 107f
secuencias interpuestas, **956**
secuencias nucleotídicas
relación de las secuencias de aminoácidos con, 281
secuencias de aminoácidos correlacionadas con, 952, 952f
secuencias reguladoras, **952**
secuencias señal recombinantes (RSS), 1021, 1021f
secuencias señal, **1101**, **1105**, 1106, 1106f, 1115f
eliminación de, 1100
en bacterias, 1109-1111, 1110f, 1111f
para el transporte nuclear, 1109, 1110f
secuencias terminales, 1033-1034, 1035f
SecYEG, 1109, 1110f, 1111f
sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa, 785, 785f, 789r
sedoheptulosa 7-fosfato
en el ciclo de Calvin, 779, 781, 782f
en la ruta de las pentosas fosfato, 565, 565f, 567f, 568f
segmentación, 1152, 1155, 1155f
segmentos C, 1020, 1020f
segmentos J, 1020, 1020f
segmentos V, 1020
segunda ley de la termodinámica, 22r
bioenergética y, 496-497, 497t
segundo, 1087-1088, 1087f, 1088f
segundos mensajeros, **440**
Ca^{2+}, 450-451, 451t, 454f

COPY STATION

localización espacio-temporal de, 451-454, 455f, 455t
cAMP,
eliminación de, 445f, 448
en la movilización de triacilgliceroles, 649, 650f
interacciones del Ca^{2+} con, 454-455
otras moléculas reguladoras que utilizan, 449-450, 450t, 451f, 452r-453r
para receptores β-adrenérgicos, 441-446, 441f, 442r-444r, 445f, 446f, 447f, 447t
diacilglicerol, 450-451, 451t, 454f
en la regulación metabólica, 575
IP_3, 450-451, 451t, 454f
nucleótidos como, 313-314, 313f
selección clónica, **175**
selección natural, 32-33
selectinas, **270**, 271-272, 271f, 272f, **405**
selenocisteína, **81**, 82s
en el código genético, 1092r
SELEX. *Véase* evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
senescencia celular, papel del telómero en, 1060
senescencia, papel de los telómeros en, 1060
señales intercelulares, regulación génica eucariótica por, 1146-1148, 1148f, 1149f, 1149t
señales intracelulares
fosfatidilinositoles y derivados de esfingosina como, 372-373
regulación génica eucariótica por, 1146-1148, 1148f, 1149f, 1149t
señalización
balsa de membranas implicadas en, 467, 468-469
canales iónicos de compuerta involucrados en, 439, 440f
neurotransmisores que interaccionan con, 472
potenciales de acción neuronales producidos por, 471, 472f
señalización eléctrica por, 470-471, 471f
toxinas dirigidas a, 472-473
en la regulación del ciclo celular, 475-476
apoptosis, 484-486, 486f
fosforilación de proteínas en, 479-480, 479f
genes supresores tumorales en, 481-484, 485f
niveles oscilantes de CDK en, 476-479, 476f, 477f, 478f, 479f
oncogenes en, 480, 481, 481f, 482r-483r
en la regulación metabólica, 575, 576f
en microorganismos y plantas, 474, 475f
GPCR. *Véase* receptores acoplados a proteínas G
guanilil ciclasa, 465-466, 466f
hormonal. *Véase* hormonas lípidos implicados en, compuestos volátiles de plantas vasculares, 375
fosfatidilinositoles y derivados de la esfingosina, 372-373
hormonas esteroides, 372, 374, 374f
icosanoides, 373-374, 373f
vitaminas A y D, 375-377, 375f, 376f, 377f
papel de CO en, 878
papeles de los nucleótidos en, 313-314, 313f
por receptores nucleares, 439, 440f
para hormonas, 902-903, 903f
regulación de la transcripción por, 473-474, 473f
proteínas adaptadoras multivalentes implicadas en, 467-469, 467f, 468f, 469f, 470f
proteínas integrales de membrana implicadas en, 405
regulación génica eucariótica por, 1146-1148, 1148f, 1149f, 1149t
RTK. *Véase* tirosina quinasas de receptores
transducción de señal,
características de, 437-439, 438f
tipos de receptores implicados en, 439, 440f
tipos de señales implicadas en, 439, 439t
señalización de abajo-arriba, hormonal, 908-909,909f, 910t
señalización de arriba abajo, hormonal, 907-908, 907f, 908f, 909f
señalización eléctrica, por canales iónicos de compuerta, 471, 471f
separación
de lípidos
cromatografía de adsorción, 380, 380f
cromatografía de gases, 380f, 381
de proteínas
cromatografía en columna, 89-90, 90f, 91f, 93t
diálisis, 89
electroforesis, 92-94, 93f, 95f
seriglicilitirosilalanilleucina, 86s
serina hidroximetiltansferasa, **692**, 692f, 693f, **866**
serina proteasas, **217**
serina, 79s, **80**, **691**, **866**
acilación y desacilación en la quimotripsina de, 216-220, 216f, 217f, 218f, 219f
biosíntesis de, 866, 866f
catabolismo de, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t
de proteoglucanos, 263, 264
en catálisis ácido-base general, 199f
en la ruta del glicolato, 787, 787
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
serotonina, **880**
biosíntesis de, 880, 881f
como neurotransmisor, 472
receptores de, 430, 472
sgRNA. *Véase* RNA de guía única
Sharp, Phillip, 1041
Shimomura, Osamu, 336-338
shiquimato, en biosíntesis de aminoácidos, 870, 870f
Shoemaker, James, 700r-701r
SIDA. *Véase* síndrome de inmunodeficiencia adquirida,
sildenafil (Viagra), 466s
silenciado génico por interferencia de RNA, 1150-1151, 1151f
silenciado postrancripción de genes por interferencia de RNA, 1150-1151, 1151f
simbiontes, **855**
bacterias fijadoras de nitrógeno, 855, 859-860, 860f
microbianos del intestino en, 940, 940f
simvastatina (Zocor), 846r-846r
sinapsis, fusión de membranas en, 404-405, 404f
sindecanos, **264**, 264f, 265-266
síndrome canceroso de Li-Fraumeni, 481
síndrome de Cockayne, 1038
síndrome de Down, 1014r
síndrome de Ehlers-Danlos, 130
síndrome de Guillain-Barré, gangliósidos en, 370
síndrome de hiperinsulinismo-hiperamonemia, 678
síndrome de Hurler, 266r
síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)
células T_H en, 175
inhibidores de la proteasa para, 220, 220f, 221f
inhibidores de la transcriptasa inversa para, 1059r
retrovirus como causa de, 1057-1058, 1058f
síndrome de la epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF), **745**, 745f
síndrome de Lesch-Nyhan, **892**
síndrome de Scheie, 266r
síndrome de Wernicke-Korsakoff, 568
síndrome de Zellweger, **663**
síndrome del shock tóxico, 269
síndrome metabólico, **941**, 942f
gestión del, 942-943, 943t
síndrome X, **941**, 942f
tratamiento de, 942-943, 943t
síndrome de Prader-Willi, 938
SINE. *Véase* elementos diseminados cortos
sintasas, **629r**
sintenia, **335**, 335f
síntesis automatizada de DNA, 301, 302f
síntesis de ácidos grasos
de cadena larga, 814, 814f
desaturación después de, 815, 815f, 816r-817r, 818
en cloroplastos, 811-812, 811f
en el citosol, 811-812, 811f
formación de malonil-CoA para, 805-806, 806f
lanzadera de grupos acetilo para, 812, 813f
palmitato, 808f, 810-811, 810f
reacciones de la ácido graso sintasa en la, 806, 807f, 808, 808f, 809f, 810-811, 810f
regulación, 812-814, 813f
secuencia de reacciones repetidas utilizada en, 806, 806f, 808, 808f, 809f, 810-811, 810f
sitios activos de la ácido graso sintasa para la, 808, 808f
síntesis de DNA translesión propensa a error, 1003-1005, 1006f, 1006t, 1007r-1008r
síntesis de DNA, dependiente de RNA, 1055, 1056f
por transcriptasas inversas, 1055, 1056f, 1057f
retrovirus en cáncer y en SIDA, 1057, 1058f, 1059r
similitudes de transposones e intrones con los retrovirus, 1057-1058, 1058f, 1060f
telomerasa como transcriptasa inversa especializada, 1058-1060, 1061f
síntesis de glúcidos,
procesos integrados en, 799-798f
ruta C4 en, 788-791, 791f
ruta de las pentosas fosfato en, 777, 799
ruta del glicolato en, 787-788, 787f, 790f
síntesis de almidón, 792-794, 795f
síntesis de celulosa en, 796-797, 796f, 797f
síntesis de glucógeno, 792
síntesis de glucosa, 792-793, 793f
síntesis de sacarosa, 792-794, 794f
síntesis de proteínas, 1069
acoplamiento de la transcripción con, 1099-1100, 1101f
cinco fases de,1099 código genético para, balanceo (wobble) en, 1076-1077, 1076f, 1077t
descifrado de, 1070-1073, 1070f, 1071f, 1072t, 1073f, 1074r-1075r, 1076t
expansión de, 1090r-1092r
lectura de,1077-1079, 1077f, 1078f, 1079f
resistencia a la mutación de, 1077
segundo, 1087-1088, 1087f, 1088f, 1089f
variaciones naturales en, 1074r-1075r
en el hígado, 912-913, 913f
estructura y función de los tRNA en, 1084-1085, 1084f, 1085f
estructura y función de ribosomas en, 1081-1083, 1082t, 1083f
fidelidad en, 1099
activación de aminoácidos, 1080, 1080f, 1081t, 1084-1089, 1085t, 1086f, 1087f, 1088f, 1089f, 1090r-1092r
elongación, 1080f, 1081, 1081t, 1095-1098, 1095f, 1097, 1098f
inicio, 1080-1081, 1080f, 1081t, 1088f, 1089, 1089f
plegamiento y procesamiento postraducción, 1080f, 1081, 1081t, 1100-1103, 1102f
terminación y reciclado de ribosomas, 1080f, 1081, 1081t, 1098-1099, 1099f, 1100r, 1101f
inhibición de, 1103-1104, 1104f
perfil ribosómico de, 1103, 1103f
por polisomas, 1099-1100, 1101f
síntesis de RNA, dependiente de RNA, 1055, 1060-1061, 1155f, 1156f
síntesis dependiente de RNA, 1062-1065, 1062f, 1064f
como clave del mundo RNA,
de DNA, 1054, 1155f, 1156f
por transcriptasas inversas, 1055, 1056f, 1057f
retrovirus en cáncer y SIDA, 1057, 1058f, 1059r
similitud de transposones e intrones con retrovirus, 1057-1058, 1058f, 1060f
telomerasa como transcriptasa inversa especializada, 1058-1060, 1061f
telomerasa como transcriptasa inversa especializada, 1058-1060, 1061f
de RNA, 1054, 1056f, 1061
síntesis química
análisis de glúcidos utilizando, 275-276
de DNA, 302f, 301
de proteínas y péptidos 102, 103f, 104t
síntesis, química. *Véase* síntesis química
sintetasas, **629r**
α-sinucleína, 150
siRNA. *Véase* RNA de interferencia pequeño
sirtuinas, 524
sistema abierto, **21**
sistema aislado, **21**
sistema anular de la corrina, **660r**
sistema cerrado, **21**
sistema D, L, **78**, 78f
en la nomenclatura de monosacáridos, 244-245, 245f
sistema de cotransporte antiparalelo (antiport) P_i-triosa fosfato, 781-783, 784f
sistema de dos componentes, **474**
de la señalización bacteriana, 474, 476f
sistema de endomembranoso, **7**
sistema de índice de DNA combinado (CODIS), 307f, 307r
sistema de restricción-modificación, **322**
sistema DNA replicasa, **987**
apareamiento de bases en, 993, 984f, 985, 985f
apilamiento de bases en, 983, 984f
ataque nucleofílico en, 983, 984f
cebador en, 984, 984f, 987
corrección de pruebas en, 984-985, 986f
direccionalidad de,
en bacterias, 982, 982f
en eucariotas, 995-996
elongación de la cadena en, 983, 984f, 990-991, 991f, 992f, 993
en bacterias, 981-994

(c) Omega Education

en eucariotas, 994-996, 995f
en los genes de inmunoglobulinas, 1020-1021, 1020f, 1021f
entrecruzado en, 1011-1012, 1013f, 1015f
enzimología de, 984f, 983-987. *Véase también* DNA polimerasas
errores en, 984-985, 986f
fosforilación en, 983-984, 984f
fragmentos de Okazaki en, 982, 983f
síntesis de, 991, 991f, 992f
hebra rezagada en, 983, 983f
síntesis de, 991, 991f
síntesis de, 991, 991f
helicasas en, 987, 989t, 988f
horquilla de replicación en, 982, 982f, 990
en bacterias, 982, 983f, 990, 991f
en eucariotas, 994-996
reparación de, 1008-1009, 1008f
inicio de, 989-990, 989t, 990f
molde de, 981, 983, 984f
precisión de, 984-985, 985f, 986f
proteínas de unión al DNA en, 987, 989t
reglas de, 981-983, 981f, 982f, 983f
reinicio independiente de origen en, 1010
sistema endocrino, 899, 900f. *Véase también* hormonas
principales glándulas del, 907, 907f
señalización de abajo arriba en, 908-909, 909f, 910t
señalización de arriba abajo en, 907-908, 907f, 908f, 909f
sistema GroEL/GroES, 146-146, 148f
sistema inmune
celular, 174
humoral, 174
interacciones proteína-ligando en, células y proteínas de la respuesta inmune, 174-176, 175t
procedimientos analíticos basados en,178, 179f
unión de anticuerpos a antígenos, 176-178, 176f, 176f, 177f, 179f
sistema inmune celular, **174**
sistema inmune humoral, **174**
sistema nervioso, señalización en, 471, 472f
sistema neuroendocrino, **900**, 900f
principales glándulas de, 907, 907f
señalización de abajo arriba en, 908-909, 908f, 909f, 910t
señalización de arriba abajo en, 907- 908, 907f, 908f, 909f
sistema RS, 78
sistema tampón ácido acético-acetato, 64, 64f
sistema tampón bicarbonato, 65-67, 66f
sistema tampón de fosfato, 65-66
sistema ubiquitina-proteasoma, 149
sistema, **21**
sistemas CRISPR/Cas, 341, 342, 342f
sistemas de alargamiento de ácidos grasos, **814**, 814f
sistemas de cotransporte, **412**
gradientes iónicos proporcionan energía para, 418-423, 418t, 420f, 421f, 422f
intercamblador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
Na+K+ ATPasa como, 415-416, 414f, 415f
sistemas proteolíticos, degradación de proteínas por, 1112-1114, 1113f, 1113t
sitagliptin (Januvia), 943t
sitio A. *Véase* sitio aminoacilo
sitio abásico, 296f, 299, **1000**
sitio activo, **158**, **192**
catálisis enzimática en, 190, 190f
de ribosomas, 1082, 1083f
sitio AP, **1000**
sitio catalítico, **158**
sitio de fijación, **157**
anticuerpo, 176-177, 175f, 176f
de proteínas, 157-158
mioglobina, 159, 159f
sitio de inserción, **984**
sitio de posinserción, **984**
sitio de salida (E), **1093**, 1093f
sitio E. *Véase* sitio de salida
sitio P. *Véase* sitio peptidilo
sitio peptidilo (P), **1093**, 1093f
sito aminoacilo (A), **1093**, 1093f
Skou, Jens, 415
Slack, Roger, 789
Sly, William, 700r-701r
SmpB. *Véase* proteína B pequeña
SNAP25, en la fusión de vesículas, 404-405, 404f
SNARE, en la fusión de vesículas, 404-405, 404f
snoRNA. *Véase* RNA nucleolar pequeño
snoRNP. *Véase* complejos snoRNA-proteína
SNP. *Véase* polimorfismos de nucleótido único
snRNA. *Véase* RNA nucleares pequeños
snRNP U1, 1042, 1044f
snRNP U11, 1043
snRNP U12, 1043
snRNP U2, 1042, 1044f
snRNP U4, 1042, 1044f
snRNP U5, 1042, 1044f
snRNP U6, 1042, 1044f
snRNP. *Véase* ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
solubilidad, de ácidos grasos, 360t, 361
soluciones acuosas
adaptaciones de los organismos vivos a, 69
interacciones débiles en
compuestos apolares, 31-53, 52f, 53f, 54t
electrostáticas, 50, 50t, 51f, 54, 54t
entropía, 51, 51f
estructura y función macromolecular y, 54-55, 54t, 55f, 56f
formación de puentes de hidrógeno, 47-50, 48f, 48t, 49f, 50f, 54, 54t
gases apolares, 51, 51t
interacciones de van der Waals, 53-54, 53t, 54t
propiedades coligativas y, 55-57, 56f
solutos polares, 49-50, 49f, 50f, 54, 54t
ionización en
constantes de disociación ácidas y, 61-62, 61
constantes de equilibrio y, 59-60
curvas de valoración y, 62-63, 62f, 63f
en agua pura, 58-59, 59f
escala de pH y, 60-61, 60f, 60t
tamponamiento de, 63
ecuación de Henderson-Hasselbalch para, 64-65
en células y tejidos, 65-68, 65f, 66f, 67f, 68r
pares ácido-base conjugados, 64-67, 64f, 65f, 66f
soluciones
acuosas. *Véase* soluciones acuosas
osmolaridades de, 55-57, 56f
soluciones hipertónicas, **56**, 56f
soluciones hipotónicas, **56**, 56f
soluciones isotónicas, **56**, 56f
solutos
anfipáticos
efectos de la estructura del agua de, 52, 52f
ejemplos de, 50t
apolares
efectos de la estructura del agua en, 51-54, 52f, 53f, 54t
ejemplos de, 50t
gases, 51, 51t
cargados, interacciones electrostáticas de, 50-51, 50t, 51f, 54, 54t
polares
ejemplos de, 50t
enlaces de hidrógeno de,49-50, 49f, 50f, 54t
propiedades coligativas y, 55-57, 56f
transporte de membrana de,
en la regulación metabólica, 575, 576f
estructuras y mecanismos de transportadores y canales iónicos, 406-408, 407f
impulso por gradientes iónicos, 418-423, 418t, 421f, 422f
por acuaporinas, 423-425, 423t, 424f
por ATPasas tipo P, 414-416, 414f, 415f
por ATPasas tipo V y tipo F, 416-417
por canales de compuerta, 427-430
por canales de K^+, 426-427, 427f, 428f
por canales iónicos, 419r-420r, 425f, 426-431, 427f, 428f, 429t, 430t
por cotransporte, 410-412, 412f, 418-422, 418t, 421f, 422f
por el intercambiador de cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
por GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
por transportadores ABC, 417-418, 417f, 418t, 419r-420r
por transporte activo secundario, 418-422, 418t, 421f, 422f
por transporte activo. *Véase* transporte activo
por transporte pasivo. Véase transporte pasivo
tipos de, 405-406, 406f
solutos anfipáticos, **52**
efectos sobre la estructura del agua de, 52, 52f
ejemplos de, 50t
solutos apolares
efectos en la estructura del agua de, 51-54, 52f, 53f, 54f
ejemplos de, 50t
gases, 51, 51t
solutos cargados, interacciones electrostáticas de, 50-51, 50t, 51f, 54, 54f
solutos polares
ejemplos de, 50t
enlaces de hidrógeno de, 49-50, 49f, 50f, 54, 54t
somatostatina
secreción pancreática de, 923, 924f, 925f
señalización del cAMP por, 449f9o
sondas fluorescentes,
estudios de rutas de señalización mediante, 450, 452r-453r
estudios sobre lípidos mediante, 400, 400f
localización de proteínas mediante, 336-338, 337f
sorafenib (Nexavar), 484r
Sos, 462, 462f
Sp1, 1145-1146, 1147f
SPM. *Véase* mediadores pro-resolución especializados
SRA. *Véase* RNA activador de receptor de esteroides
Src, autoinhibición de, 467, 467f, 468f
SREBP-1c, **895**
SREBP. *Véase* proteínas de unión del elemento regulador de esteroides
sRNA. Véase RNA pequeños
SRP. *Véase* partícula de reconocimiento de la señal
SSB. *Véase* proteína de unión al DNA de cadena sencilla
SSR. *Véase* secuencias repetidas sencillas
Stahl, Franklin, 981
Stallings, Patricia, 700r-701r
STAT. *Véase* transductores de señal y activadores de la transcripción
Steitz, Thomas A., 1082
STR. *Véase* repetición en tándem corta
Streptomyces lividans, canales de K^+ de, 426, 427f
stRNA. *Véase* RNA temporal pequeño
Strong, Frank, 524
subenrollamiento, **959**
del DNA, 958-959, 959f
los números de enlace miden el, 959-961, 960f, 961f
topoisomerasas cambian, 961-964, 962f, 963f, 963t, 964r-965r
succinato deshidrogenasa, **630**, **715**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 630
en la cadena respiratoria mitocondrial, 713t, 714f, 715-716, 716f
mutaciones en, 639-640
succinato, **629**
como oncometabolito, 640
conversión del succinil-CoA en, 623f, 628-630, 629r, 630f
en el ciclo del glioxilato, 795, 795f
oxidación de, 623f, 630
succínico tioquinasa, **629**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 628-629, 629r, 630f
succinil-CoA sintetasa, **629**
en el ciclo del ácido cítrico, 623f, 628-630, 629r, 630f
succinil-CoA, **626**
como precursor biosintético, 633
conversión de aminoácidos en, 688f, 698-700, 699f, 700r-701r
conversión en succinato, 623f, 628-630, 629r, 630f
oxidación del α-cetoglutarato a, 625f, 626-628, 628f
Sudhof, Thomas C., 404
sulfolípidos, 367, 367f
Sumner, James, 190
sunitinib (Sutent) 484r
superenrollamiento negativo, 960, 960f
superenrollamiento plectonémico, **964**, 965f, 966f
superenrollamiento positivo, 960f, 961
superenrollamiento solenoide, **964**, 966f
superenrollamiento, **957**
del DNA, 957, 957f, 958f
números de enlace describen, 959-961, 960, 961f
plectonémico y solenoide, 964, 965f, 966f
replicación y transcripción y, 957, 958f
subenrollamiento de, 958-961, 959f, 960f, 961f

topoisomerasas cambian, 961-963, 962f, 963f, 963t, 964r-965r
superfamilia facilitadora principal (MFS), **420**
superfamilias, **141**
superficie celular
esfingolípidos en, como sitios de reconocimiento biológico, 369-370, 370f
glucoproteínas de, 268
lectinas de, 270-272, 271f, 272f
proteoglucanos de, 263-267, 263f, 264f, 265f, 267f
superóxido dismutasa, 300, **723**
suplementos de aceite de pescado, 361
supresores sin sentido, **1100r**
surco mayor, **288**, 289f
surco menor, **288**, 289f
sustancia basal. *Véase* matriz extracelular
sustancias anfotéricas, **81**
sustancias cristalinas, entropía al disolver, 51, 51f
sustrato-1 del receptor de insulina, **461**, 462f, 463-464, 463f
sustratos, **158**, **192**
de enzimas, 192, 192f, *Véase también* complejo enzima-sustrato
efectos de concentración de, 201-202, 201f, 229-230, 230f, 576f, 577-578, 577f, 578t, 583-585, 584f, 584r-585r
reacciones con dos o más,
Sutent. *Véase* sunitinib
Sutherland, Jr., Earl W., 604

T

t-SNARE, **404**, 404f
T. *Véase* timina
T_3. *Véase* triyodotironina,
T_4. *Véase* tiroxina,
tadalafil (Cialis), 466s
Tagamet. *Véase* cimetidina
Tamiflu. *Véase* oseltamivir
tamoxifeno, **474**, 474s
tampones, **63**, 64
aminoácidos como, 66, 65f, 84
composición de, 63-64, 64f
ecuación de Henderson-Hasselbalch para, 64-65
en células y tejidos, 65-67, 65f, 66f, 67f, 68r
tándem MS (MS/MS) **101**, 102, 102f
análisis de glúcidos mediante, 274-276
Taq polimerasa, 301, 303f
Tarceva. *Véase* erlotinib
tasa de filtración glomerular (GFR), **919r**
Tatum, Edward, 961-962
TBP. *Véase* proteína de unión a TATA
tecnología del DNA recombinante, **320**. *Véase* también clonación del DNA,
tecnologías de secuenciación del DNA, **305**
avances en, 305, 308-311, 508f, 309f
huella, 1032r
tejido adiposo
beige, 916 blanco, 914-915, 915f
captación de glucosa por, 409-410, 411r, 545, 548f
efectos de la adrenalina sobre, 929, 929t
efectos de la insulina sobre, 923, 923t, 924f
efectos del cortisol sobre, 930
efectos del glucagón sobre, 925-926, 926t, 927f
en el estado de inanición, 927-929, 927t, 928f, 929f
funciones endocrinas de, 931-933, 932f
funciones metabólicas de, 914-916, 915f, 916f
gliceroneogénesis en, 823, 823f, 824f
marrón, 740, 740f, 915-916, 915f, 916f
reciclado de triacilgliceroles en, 822, 822f
tejido adiposo blanco (WAT), 914, 915, 915f
tejido adiposo marrón (BAT), **740**, 740f, **915**, 915f
tejidos
daño a, ensayos de enzimas hepáticos para, 684, 686r
funciones metabólicas específicas de, 910, 911f
cerebro, 920-921, 920f
hígado, 910-914, 912t, 913f, 914f
músculo, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
sangre, 921-922, 921f, 922f
tejidos adiposos, 914-916, 915f, 916f
tampones en, 65-67, 65f, 66f, 67f, 68r
tejidos adiposos, 914-916, 915f, 916f
telomerasa, **1059**
como transcriptasa inversa especializada, 1058-1060, 1061f
telómeros, **956**, 956f, 957, 957t, **996**, 1058-1060, 1061f
Temin, Howard, 1055
temperatura, variación de la composición de la bicapa lipídica con, 398, 398t
teoría quimiosmótica, **707**, 723
de la fosforilación oxidativa, 707-708, 707f
estequiometrías no integrales del consumo de O_2 y de síntesis de ATP en, 733-734
oxidación y fosforilación, acoplamiento 724-727, 726f, 727f
terminación, **1098**
de la replicación del DNA, 993-994, 994f, 995f
de la señalización por receptores β-adrenérgicos, 446-448
de la síntesis de proteínas, 1080-1081, 1080f, 1081t, 1097, 1099f, 1100r
rescate de ribosomas y, 1099, 1101
de la transcripción dependiente de DNA, 1033-1034, 1035f
terminadores dependientes de ρ, 1033, 1033f, 1035f
terminadores independientes de ρ, 1033-1034, 1035f
terminadores, de *E. coli*, 1033-1034, 1035
termodinámica, 20-27, 22r-23r, 24f
bioenergética y,
efectos de la concentración de reactivo y producto sobre los cambios de energía libre reales, fuentes de energía libre en las células, 497
naturaleza aditiva de los cambios de energía libre, 500-501
primera y segunda leyes de la termodinámica, 496-497, 497t
relación entre cambio de energía libre estándar y constante de equilibrio, **194**, 194t, 497-499, 498t, 499t
constantes físicas y unidades utilizadas en, 497t
de la catálisis enzimática, 194, 194t, 500
de los centros de reacción fotoquímicos, 762
del plegamiento de proteínas, **145**, 146f
termogénesis, **915**
en el tejido adiposo marrón, 740, 740f, 915-916, 915f, 916f
en plantas, 723, 724r-725r
mitocondrial, 740, 740f
temblor, 919
termogenina. *Véase* proteína desacoplante 1
territorio cromosómico, 973f, 973t
territorios, cromosomas, 973f, 974
test SGOT, 686r
test SGPT, 686r
testosterona, como derivado del colesterol, 374f
tetania, alcalosis causante de, 68
tetraciclinas, **1103**, 1104s
tetrahidrobiopterina, **691**
en el catabolismo de la fenilalanina, 697, 697f
tetrahidrocannabinol (THC), 939, 939f
tetrahidrofolato (H_4 folato), **689**
en el metabolismo de serina y glicina, 691-692, 693f
en la degradación de aminoácidos, 688-691, 689f, 690f
en la síntesis de timidilato, 890-891, 891f
tetraplex G, **289**, 292f
Tetrhymena thermophila, 1042-1052
tetrodotoxina, 430, 472-473
TF. *Véase* factor tisular
TFP. *Véase* proteína trifuncional
TFPI. *Véase* inhibidor proteico del factor tisular
THC. *Véase* tetrahidrocannabinol
Thomson, James, 1159
Thudichum, Johann, 369
tiamina pirofosfato (TPP), 555
en el complejo PDH, 619
en la reacción de la transcetolasa, 567, 567f, 568f
en reacciones de fermentación, 555, 555f, 558t
tiamina. *Véase* vitamina B_1
tiazolidinadionas, **828**, **942**, 943, 943t
efectos sobre la gliceroneogénesis de, 823
tilacoides estromales, **753**
tilacoides granales, 753
tilacoides, **753**
timidilato (TMP),
biosíntesis de, 890-891, 891f
degradación de, 891-892, 892f, 893f
timidilato sintasa, **890**, 891f
inhibición de, 894, 894f, 895f
timina (T), **282**, 282s, 282t
apareamiento de base de, 286, 287f
degradación de, 891-892, 892f, 893f
en el DNA, razones evolutivas de, 298
metilación de, 300-301
tioésteres, **510**, **619**
energía libre de hidrólisis de, 509-510, 509f, 510f, 511f, 511t
tioforasa. *Véase* β-cetoacil-CoA transferasa
tiolasa, **654**
en la formación de cuerpos cetónicos, 666-667, 667f
en la oxidación de ácidos grasos, 633f, 654
tioles, como grupos salientes activadores, 506
tiólisis, 653f, 654
tiorredoxina reductasa, **888**, 888f
tiorredoxina, **785**, 785f, **887**
en la síntesis de desoxirribonucleótidos, 888, 888f
tipo de grupo sanguíneo, gangliósidos y, 268-269, 369-370, 370f
tiritera termógena, **919**
tiroglobulina, 906
tirosina quinasas de receptor (RTK), **460**
inhibición de, para el tratamiento del cáncer, 482r-483r INSR
cascada de fosforilación iniciada por, 460-463, 461f, 462f
interacciones en señalización por, 464, 464f, 465f
papel de PIP_3 en la señalización por, 463-464, 463f, 464f, 465f
tirosina, **79**, 79s, 80f, 80r, **694**, **871**
biosíntesis de, 871, 873f
catabolismo de, 688, 688f, 696, 696f
en catálisis ácido-base general, 199f
en proteínas de membrana, 395, 396f
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
síntesis de neurotransmisores a partir de, 880, 881f
sustancias vegetales derivadas de, 880, 880f
tirotropina, reconocimiento por lectina de, 270
tiroxina (T_4), 906
titina, 87, 87t, **182**
TLC. *Véase* cromatografía en capa fina
TLS polimerasa, 1005
TMP. *Véase* timidilato
tmRNA. *Véase* RNA de transferencia-mensajero
TNF. *Véase* factor de necrosis tumoral
tocoferoles, **378**
como cofactores de oxidación-reducción, 377-378, 377f
todo α, **140**
todo β, **140**
todo-*trans*-retinol, **376**
como precursor hormonal, 375-377, 376f, 377f, 906
tolbutamida, 924
tomografía de emisión de positrones (PET), diagnosis de tumores mediante, 547r
topoisomerasas tipo I, **961**, 962, 962f, 963t
topoisomerasas tipo II, **961**, 962-963, 963f, 963t
topoisomerasas, **897**, **961**
en el DNA, 961-963, 962f, 963t, 964r-965r
en la cromatina, 968, 972
en la replicación del DNA, 989-993, 989t
inhibición de, 964r-965r
topoisómeros, **961**
topología, **958**
de DNA superenrollado, 958
de GLUT1, 409, 409f
de proteínas integrales de membrana, 392-393, 393f
predicción de secuencia de aminoácidos de, 394-395, 395f, 396f
topotecan (Hycamtin), 965r
toxina botulínica (Botox), 405
toxina del *Clostridium botulinum*, 404-406
toxina del *Clostridium tetani*, 405
toxina del cólera, **444r**, 524
toxina diftérica, **1104**
toxina tetánica, 405
toxinas,
amoníaco, 680
botulínica, 405
canales iónicos como diana de, 430-431, 471
del cólera, 443r-444r, 524
inhibición de la síntesis de proteínas por, 1103-1104, 1104f
tetánica, 405
TPP. *Véase* tiamina pirofosfato
Trabajo
mecánico, producción por el músculo de, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f
por flujo electrónicos, 517
trabajo mecánico, producción por el músculo de, 916-920, 917f, 918f, 918r-919r, 920f

FOR CLASSROOM USE

tracrRNA, **342**, 342f, 343
TRADD, en apoptosis, **485**, 486f
traducción, 949, **1070**. *Véase también* síntesis de proteínas
tráfico de membranas, 390, 391f, 829
trans-Δ^2-butenil-ACP, 809f, 810
trans-Δ^2-enoil-CoA, **653**, 653f
transaldolasa, **565**
en la ruta de las pentosas fosfato, 565-568, 565f, 567f, 568f
transaminasas, **677**
en la transferencia de grupos α-amino al α-cetoglutarato, 677, 577f, 678f, 679f
transcetolasa, **565**, **779**
defectos en, 568
en el ciclo de Calvin, 779, 781f
en la ruta de las pentosas fosfato, 565-568, 565f, 567f, 568f
transcripción, **293**, 949, **1027**
acoplamiento de la traducción con, 1099-1100, 1101f
dependiente de DNA,
factores proteicos para, 1034-1038, 1036t, 1037f
inhibición selectiva en, 1038, 1039
protómeros en, 1030-1031, 1031f, 1033f
regulación de, 1031, 1039f
RNA polimerasas en, 1028-1030, 1028f, 1029f, 1030f
RNA polimerasas nucleares en, 1034, 1035f
terminación de, 1033-1034, 1035f
elongación de, 1031, 1033f
hebra molde para, 1029, 1029f
inicio de, 1030-1031, 1033f
por RNA polimerasa II, 1036-1039, 1037f
regulación de. *Véase* regulación génica
replicación del DNA comparada con, 1028
secuencias reguladoras de, 1029, 1029f
superenrollamiento del DNA y, 957, 958f
tasa de error de, 1030
transcrito primario, 1039
transcriptasas inversas, **1055**, 1056f, 1057f
del VIH, 1057, 1059r
telomerasas como, 1058-1060, 1061f
transcriptoma, **577**, **1027**
transcrito primario, **1039**
adición de la cola de poli(A) a, 1045, 1045f, 1046f
formación y procesamiento de, 1039-1040, 1040f
transdesaminación, **678**
transducción de señal, **437**
características de, 437-439, 438f
tipos de receptores implicados en, 439, 439t
tipos de señales implicadas en, 439, 439t
transducción, señales. *Véase* transducción de señal
transducciones de energía, **496**
transducina, en la señalización de la visión, 456-458, 456f, 457f, 458r
transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), **934**
en la señalización por leptina, 933-934, 934f
transfección, **329**
transferasas, 191
transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), **452r**
estudios de rutas de señalización mediante, 450, 452r-453r
transferencia de excitones, **755**
en el centro de reacción Fe-S, 760-761
en el centro de reacción feofitina-quinona, 759-760, 761f
en el fotosistema II, 761f, 763-765,
en la clorofila, 756, 759f
transferencia electrónica
en la fijación de nitrógeno, 858, 859f
en la fosforilación oxidativa, 707-708, 707f
síntesis de ATP acoplada a, 724-727, 726f, 727f
en reacciones de oxidación-reducción biológicas, 506, 506f, 517
deficiencia de niacina y, 524, 525f
deshidrogenación, 518-519, 518f
deshidrogenasas implicadas en, 522-523, 522f, 523f
funciones del NAD^+ fuera de, 524
medias reacciones que describen, 517-518
NADH y NADPH en, 522-524, 522f, 523f, 525f
nucleótidos de flavina en, 524-525, 525f
oxidación de glucosa a CO_2, 521
potenciales de reducción de, 519-521, 519f, 521t
trabajo producido por el flujo electrónico en, 517
transportadores electrónicos en, 522-523, 522f, 523f
variación de energía libre de, 520, 521t
en reacciones de oxidación-reducción, 517
energía a partir de, 21
inhibición de, 715t
por la cadena respiratoria mitocondrial. *Véase* cadena respiratoria mitocondrial
transferencia génica horizontal, **105**
transferencia génica, lateral, 105
transferencia Western, **178**, 179f
transferencias de grupo fosforilo, 504-506, 505f
a partir del 1,3-bisfosfoglicerato al ADP, en el séptimo paso de la glucólisis, 536f, 541-544
ATP y
cambio de energía libre en la hidrólisis de ATP, 507-509, 508f, 508t
compuestos fosforilados y tioésteres con grandes energías de hidrólisis, 509-510, 509f, 510f, 511f, 511t
en el ensamblaje de macromoléculas informativas, 514
en el transporte activo y contracción muscular, 511, 514-516
en transfosforilaciones entre nucleótidos, 514-516, 516
energía proporcionada por, 510-513, 512f
polifosfato inorgánico como dador de grupo fosforilo, 516
reacciones involucradas en, 513-514, 513f, 515r
desde el fosfoenolpiruvato al ADP, como último paso de la glucólisis, 536, 543-544
transferrina, **626r**, 627r
transformación, **324**
transfosforilaciones, entre nucleótidos, energía del ATP para, 514-516, 516f
translocación **1096**, 1097, 1098f
translocasa, **1096**, 1097, 1098f
transmembrana de la fibrosis quística
transpeptidasa, inhibición por antibióticos de, 225-227, 226f, 227f
transportador de citrato, **812**, 813f
transportador de glucosa 1 (GLUT1)
defectos en, 409 en tumores, 546r-547r
transporte pasivo mediado por, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
transportador de glucosa 2 (GLUT2), 409-410, 410t, 421f, 422f, 422, **589**
transportador de glucosa 3 (GLUT3), en tumores, 546r-547r
transportador de glucosa 4 (GLUT4), 410, 410t, 411r
en diabetes mellitus tipo 1, 545-548, 548f
regulación por insulina de, 463-464, 463f
transportador de lactosa, **419**, 421f, 421
transportador de piruvato mitocondrial (MPC), **618**
transportador multifármacos (MDR1), **418**
transportador T1, 599, 601f
transportadores ABC. *Véase* transportadores casette de fijación de ATP
transportadores activos primarios, **406**
transportadores activos secundarios, **406**
transportadores activos, **406**
ATPasas tipo P, 414-416, 414f, 415 ATPasas tipo V y tipo F, 416, 416f
transportadores ABC, 417-418, 417s, 418t, 419r-420r
transportadores casette de fijación de ATP (ABC), **417**
defectos en, 417-418, 419r-420r
utilización de ATP por, 417-418, 417f, 418t
transportadores electrónicos
coenzimas y proteínas que actúan como, 521-522
en la cadena respiratoria mitocondrial, 710-713, 771f, 712f, 712t, 713f
Complejo I, 713-716, 713t, 714f, 715t
Complejo II, 713t, 714f, 715-716, 716f
Complejo III, 713t, 714f, 716-717, 717f
Complejo IV, 713t, 714f, 717-718, 718f, 720f, 738
en respirasomas, 719, 719f, 720r-721r
NADH y NADPH como, 522-523, 522f, 523f
para la oxidación celular de la glucosa, 521
transportadores electrónicos unidos a membrana, en la cadena respiratoria mitocondrial, 710-713, 711f, 712f, 712t, 713f
transportadores pasivos, **406**
GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
intercambiador cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
transportadores. *Véase también* transportadores específicos
activos, 406
ATPasas tipo P, 414-416, 414f, 415f
ATPasas tipo V y tipo F, 416-417, 416f
transportadores ABC, 417-418, 417f, 418t, 419r-420r
en regulación metabólica 575, 576f
estructuras y mecanismos de, 406-408, 407f
pasivos, 406
GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410f, 410t, 411r
intercambiador de cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
transporte
activo, 406, 406f
contra gradiente de concentración o electroquímico, 412-413, 412f
energía del ATP para, 514
gradientes iónicos proporcionan energía para, 418-422, 418t, 421f, 422f
impulso por fuerza protón-motriz, 734-735, 734f
de ácidos grasos al interior de la mitocondria, 650-652, 651f, 652f
de CO_2, 170-171, 170f
de colesterol
por endocitosis mediada por receptor, 838-839, 840f
por HDL, 836f, 837f, 839-840, 839f, 841f, 844, 844f
por lipoproteínas plasmáticas, 836-838, 836f, 837f, 838r, 839f
regulación de, 840-844, 841f, 842f, 843f, 845r-846r
de ion hidrógeno, 170-171, 170f de oxígeno, 163
de proteínas
al núcleo, 1109, 1110f
en bacterias, 1109-1111, 1110f, 1111f
endocitosis mediada por receptor en, 1111-1112, 1111f, 1112f
glucosilación para, 1106-1109, 1107f, 1108f
modificación postraducción en el retículo endoplasmático para, 1105-1106, 1106f, 1107f
de solutos a través de membranas,
en la regulación metabólica, 575, 576f
estructuras y mecanismos de transportadores y canales iónicos, 406-408, 407f
impulsado por gradientes iónicos, 418-423, 418t, 421f, 422f
por acuaporinas, 423-425, 423t, 424f
por ATPasas tipo P, 414-416, 414f, 416f
por ATPasas tipo V y tipo F, 416, 416f
por canales de compuerta, 427-430
por canales de K^+, 426-427, 427f, 428f
por canales iónicos, 419r-420r, 425-431, 425f, 427f, 428f, 429t, 430t
por cotransporte, 410-412, 412f, 418-422, 418t, 421f, 422f
por GLUT1, 408-410, 408f, 409f, 410t, 411r
por intercambiador de cloruro-bicarbonato, 410-412, 412f
por transportadores ABC, 417-418, 417f, 418t, 419r-420r
por transporte activo secundario, 418-422, 418t, 421f, 422f
por transporte activo. *Véase* transporte activo
por transporte pasivo. *Véase* transporte pasivo
tipos de, 405-406, 406f
del amoníaco
por alanina, 680, 681f
por glutamina, 678-680, 680f
pasivo, 406, 406f
transporte activo primario, 412-413, 412f
transporte activo secundario, 412-413, 412f
gradientes iónicos que proporcionan energía para, 418-422, 418t, 421f, 422f
transporte activo, **406**, 406f
contra un gradiente de concentración o electroquímico, 412-413, 412f
energía del ATP para el 414
gradientes iónicos que proporcionan energía para el, 418-422, 418t, 421f, 422f
impulsado por la fuerza protón-motriz, 734-735, 734f
transporte electrogénico, **413**, 416
transporte inverso del colesterol, **840**
por HDL, 839, 841f, 844, 844f
transporte pasivo, **406**, 406f
transposición directa, 1019, 1019f

Copyrighted Material

transposición replicativa, 1019, 1019f
transposición simple, 1019, 1019f
transposición, **1005**, **1018**
directa, 1019, 1019f
en bacterias, 1018-1020, 1019f
en eucariotas, 1019
replicativa, 1019, 1019f
simple, 1019, 1019f
transposones bacterianos, 1019
transposones complejos, **1018**
transposones, **346**, **1018**
bacterianos, 1018, 1019
complejos, 1018
del mundo RNA, 1065
en el genoma humano, 346, 346f
eucarióticos, 1019
recombinación de, 1018-1020, 1019f
similitudes de los retrovirus con, 1057-1058, 1058f, 1060f
transtiretina, 149
traslación de mella, 986-987, 986f
trasnformilasa, 1089
trastuzumab (Herceptin), 484r
tratamiento de desechos, bacterias anammox en, 856r-857r
trazado de partícula única, estudios de difusión de lípidos mediante, 400, 400f
trehalosa, 253, 253f
treonina, 79s, **80**, **694**, **700**, **869**
biosíntesis de, 868-870, 868f-869f
catabolismo de, 688-689, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t, 695f, 696f, 698-700, 699f, 700r-701r
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
tretinoína (Retin-A), 376
TRH. *Véase* hormona liberadora de tirotropina
triacilgliceroles, **362**
ácidos grasos en. *Véase* ácidos grasos
activación de, 650-652, 651f, 652f
como lípidos de reserva,
almacenamiento energético y aislamiento proporcionado por, 362-363, 362f
como ésteres de ácidos grasos y glicerol, 362, 362f
hidrogenación parcial de, 363, 363f
digestión de, absorción en el intestino delgado, 648-649, 648f, 649f
en el tejido adiposo, 914-915, 915f
movilización de, 649-650, 650f, 651f
oxidación de. *Véase* oxidación de ácidos grasos
síntesis de,
gliceroneogénesis para, 823, 823f, 824f
precursores para, 820-821, 821f
regulación hormonal de, 821-823, 822f
transporte de, 650-652, 651f, 652f
triacontanilpalmitato, 364f
tríada catalítica, **217**
Triconympha, degradación de la celulosa por, 257, 257f
TriCor. *Véase* fenofibrato
tricrómatas con anomalía en el rojo, **458**
tricromatos anómalos verdes, **457**
triglicéridos. *Véase* triacilgliceroles
trimetil-lisina, 1102f
trimetoprim, **895**
triosa fosfato isomerasa, 197-199, **540** en la ruta glucolítica, 536f, 539, 542f
triosa quinasa, **551**
triosas fosfato
conversión en sacarosa y almidón, 793-794, 794f, 795f
en el ciclo de Calvin, 779-781, 783f, 784f
sistema de compuerta antiparalela P_i-triosa fosfato para, 781-783, 783f, 784f
en la ruta glucolítica, 535f, 536, 536f, 539, 541f
interconversión de, 536, 540, 541f
movimiento de, 798f, 799
regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato a partir de, 799, 781f, 782f, 783f
triosas, 244, 244f
tripanosomas, 1045
tripsina, 98, **675**, 676
zimógenos de, 232, 233, 234f
tripsinógeno, 232, 234f, **675**, 676
triptófano 2,3-dioxigenasa, 816r
triptófano sintasa, **871**, 871f, 872f
triptófano, **79**, 79s, 80, 80f, 80r, **691**, **694**, **870**
biosíntesis de, 870-671, 871f, 872f
catabolismo de, 688, 688f, 691-694, 692f, 693f, 694t, 695f, 699f
en proteínas de membrana, 395, 396f
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
regulación por *E. coli* de, 1132-1134, 1132f, 1133f
síntesis de neurotransmisores a partir de, 880, 881f
sustancias vegetales derivadas de, 880, 880f
trismus mandibular, 405
trisomía, 1014
triyodotironina (T_3), 906
TrkA. *Véase* receptor del factor de crecimiento nervioso de alta afinidad
tRNA nucleotidiltransferasa, 1049
tRNA. *Véase* RNA de transferencia
troceador (Dicer), 1051f
troglitazona (Rezulin), 943t
trombina, **234**
en la coagulación de la sangre, 234-236, 235f
heparán sulfato y, 264-267, 265f
trombomodulina, 235f, **235**
tromboxano sintasa, 816f, **819**
tromboxanos (TX), **235**, 373f, **374**, **819**, 905
síntesis de, 818-819, 818f
tropinas. *Véase* hormonas trópicas
tropomiosina, **183**, 183f
troponina C, 137f
troponina, **183**, 183f, 452
Trypanosoma brucei gambiense, 213r-214r, 895
Tsien, Roger, 336
tubocurarina, 430
tumores
defectos de la ubiquitinación en, 1114
diagnóstico de, 547r
gangliósidos en, 369
glucólisis en, 544, 546r-547r, 618
mutaciones en el ciclo del ácido cítrico en, 639-640, 639f
mutaciones en el Complejo II en, 715-716
mutaciones Ras en, 443r
papel de MDR1 en, 418
papel de PTEN en, 463 pérdida de la regulación del ciclo celular en,
papel de los oncogenes en, 480, 481, 481f, 482r-483r
papel de los genes supresores de tumores en, 484-484, 488f
proteína p29 en, 339f
tratamiento de. *Véase* medicamentos quimioterápicos
tumores gastrointestinales estromales, 484r
tunicamicina **1106**, 1107f
TX. *Véase* tromboxanos

U

U. *Véase* uracilo
UAS. *Véase* secuencias activadoras del lado 5'
ubiquinona (Q), 377f, 378, **710**
en la cadena respiratoria mitocondrial, 710, 711f
donación de electrones vía, 719-720, 719f
transferencia de electrones del Complejo I a, 713-715, 713t
transferencia de electrones del Complejo II a, 713t, 714f, 715, 716, 716f
ubiquinona citocromo *c* oxidorreductasa, 713t, 714f, **716**, 716f, 717, 717f
ubiquitina, **477**, **1112**
en la degradación de ciclinas, 477, 478f
en la degradación de proteínas, 1113-1114, 1113f, 1113t
ubiquitinación, 230, 231f
defectos en, 1114
UCP1. *Véase* proteína desacoplante 1
UDP-glucosa, 600s, **793**, 793f
en glucogénesis, 600-602, 602f, 603f
en síntesis de celulosa, 796-797, 797f
en síntesis de sacarosa, 793, 793f
UDP-glucosapirofosforilasa, **601**, 602f
UDP. *Véase* uridina difosfato
úlceras gástricas, lectinas en el desarrollo de, 271, 272f
úlceras, lectinas en el desarrollo de, 271, 272f
UMP. *Véase* uridilato
único RNA guía (sgRNA), **342**, 342f
unidad de masa atómica, 13r
unión cooperativa
cambios conformacionales en, 165-166, 166f, 167f
descripción cuantitativa de, 166-167, 167f
hemoglobina y monóxido de carbono, 168r-169r
hemoglobina y oxígeno, 165-166, 168f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
unión de extremos no homólogos (NHEJ), **1007**, **1015**, 1016, 1016f
unión heterotrópica, **166**
unión homotrópica, **166**
unión reversible, interacciones proteína-ligando
cooperativas, 165-170, 166f, 167f, 170f
descripción cuantitativa de, 160-162, 160f, 161t, 166-167, 167f
estructura de subunidades de la hemoglobina, 163-164, 163f, 164f
familia globina de proteínas de fijación de oxígeno, 159
hemoglobina en la anemia falciforme, 172-174, 172f, 173f
influencia de la estructura proteica sobre, 162-163, 162f
modelos mecanísticos de, 168-170, 170f
regulación de, 171-172, 171f, 172f
transporte de dióxido de carbono por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de iones hidrógeno por la hemoglobina, 170-171, 170f
transporte de oxígeno por la hemoglobina, 163
unión de monóxido de carbono por la hemoglobina, 168r-169r
unión de oxígeno por hemo, 158-159, 158f, 159f
unión de oxígeno por la hemoglobina, 164-166, 165f, 166f, 167f, 171-172, 171f, 172f
unión de oxígenos por la mioglobina, 159, 159f
universo, **21**
UP. *Véase* promotor del lado 5'
UPR. *Véase* respuesta de proteína desplegada
uracilo (U), 282, 282s, 282t
a partir de la desaminación de citosina, 298f, 299
biosíntesis de, 885, 886f, 887f
en el DNA, 891
formas tautoméricas de, 286, 286f
uracilo DNA glucosilasas, 1000-1001
urato oxidasa, **891**, 892f
urea, **682**
a partir de la degradación de pirimidinas, 891-892, 892f, 893f
catabolismo de nucleótidos que producen, 891-892, 892f, 893f
ureasa, 425
aislamiento y cristalización de, 190
transporte por acuaporina de, 425
uridilato (UMP), 283s, 514
biosíntesis de, 886, 886f, 887f
uridililtransferasa, **862**, 862f
uridina difosfato (UDP), 551, 551f
uridina trifosfato (UTP), como portador de energía química, 311-312, 311f, 312f
uridina, 283s
urobilinógeno, 876, 878, 877f
utilización de rho (rut), 1033
UTP. *Véase* uridina trifosfato
UvrA, 1001, 1006t
UvrB, 1001, 1006t
UvrC, 1001
UvrD, 1001

V

v-SNARE, **404**, 404f
V_0. *Véase* velocidad inicial
vacuolas, 7, 8f
Vagelos, P. Roy, 845r-846r
vaina de mielina, composición de, 388, 388t
valdecoxib (Bextra), 819
valina, **79**, 79s, **700**, **869**
biosíntesis de, 868f-869f, 869, 871
catabolismo de, 688f, 698-702, 699f, 700r-401r
propiedades y convenciones asociadas a, 77t
valinomicina, 422f 423, 427, 715t
vanadato, **414**
Vane, John, 373
variación de energía libre estándar ($\Delta G'^{\circ}$), 25-27, **26**, **193**, **498**
de enzimas metabólicos, 579-580, 579t
de hidrólisis
compuestos fosforilados y tioésteres, 509-510, 509f, 510f, 511f, 511t
de ATP, 507-509, 508f, 508t
de la formación de acil graso-CoA, 513
de la gluconeogénesis y la glucólisis, 658, 558t
de la síntesis de ATP en la superficie de la ATP sintasa, 728, 728f
de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, 720-722
de reacciones de oxidación-reducción, 520-521, 521t
en centros de reacción fotoquímicos, 762

COPYRIGHTATION

en las reacciones enzimáticas, 192, 192*f*
naturaleza aditiva de, 500-501
relación de la constante de equilibrio estándar con, 194, 194t, 497-499, 498t, 499t
variación de fase, **1138**
en *Salmonella typhimurium*, 1138, 1138*f*, 1139t
variaciones naturales en, 1074r-1075r
vasopresina, 908*f*
regulación de agua por, 411r, **424**
vectores de clonación, **320**
BAC, 325, 326*f*
expresión, 328, 328*f*
plásmidos, 324-325, 324*f*, 325*f*
YAC, 326-327, 327*f*
vectores de expresión, **326**, 328*f*
vectores lanzadera, **326**
vectores, clonación. *Véase* vectores de clonación
VEGFR. *Véase* receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
velocidad de reacción. *Véase* velocidades de reacción
velocidad inicial, (V_0), **201**
de reacciones catalizadas por enzimas, 201-203, 201*f*, 203*f*
enzimas alostéricos, 229-230, 230*f*
del transporte de glucosa, 408, 408*f*
velocidad máxima (V_{max}), **201**
de reacciones catalizadas por enzimas, 201-203, 201*f*, 203*f*
enzimas alostéricos, 229-230, 230*f*
determinación de, 203, 204*f*
del transporte de glucosa, 408, 408*f*
efectos inhibidores reversibles sobre, 211-212, 211t
interpretación de, 203-206, 204t, 205t
velocidades de reacción
constantes de velocidad en, 194-195
denotación de, 160
relación de la energía de activación con, 194
definición termodinámica de, 194-195, 194t
efectos enzimáticos sobre,
efectos de equilibrio comparados con, 192-194, 192*f*, 193*f*
estudio de. *Véase* cinética enzimática
reducción de entropía y, **198**, 198*f*
Venter, J. Craig, 343
venturicidina, 715
inhibición de la fosforilación oxidativa por, 725
vesículas, **390**, 390*f*
fusión de, 403-405, 403*f*, 404*f*
vía extrínseca, 235
en la coagulación de la sangre, 235, 235*f*
Viagra. *Véase* sildenafil
vías anfibólicas, **634**
el ciclo del ácido cítrico como, 634, 635*f*
Vías de recuperación **882**
reciclado de bases púricas y pirimidínicas vía, 892-893
vías, metabólicas, **28**, 29
Vibrio cholerae, 443r-444r
vida media, de las proteínas, 576, 576t, 1113, 1113t
VIH. *Véase* virus de inmunodeficiencia humano
vimentina, **182**
vinblastina, resistencia tumoral a, 418
Vioxx. *Véase* rofecoxib
virus de la gripe
eliminación del casquete por, 1040-1041
selectinas de, 271, 272*f*
virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), 1057, 1058*f*
células T_H en, 175-175
inhibidores de la proteasa del, 217, 220, 220*f*, 221*f*
inhibidores de la transcriptasa inversa del, 1059r
virus
de RNA, 1060. Véase *también* retrovirus
DNA de, 951, 952, 951*f*, 953t, 997
DNA polimerasas de, 996-997
eliminación del casquete por, 1041
expresión de proteínas recombinantes mediante, 328-329, 330*f*
genoma de, 319
información codificada en, 1029, 1029*f*
oncogenes en, 480, 1057, 1058*f*
selectinas de, 271, 272*f*
virus del sarcoma de Rous, 1057, 1058*f*
virus DNA, 996
virus herpes simplex, DNA polimerasa de, 996
virus tumorales RNA, 1057, 1058*f*
virus tumorales, 1057, 1058*f*
virusoides, 1052
visión 456-458, 456*f*, 457*f*, 458r
papel de la vitamina A en, 377
señalización por GPCR en,
visión de color, 457, 457*f*, 458r
vitamina A_1, **376**
como precursor hormonal, 375-377, 376*f*, 377*f*, 906
vitamina B_1
deficiencia de, 555, 568, 621
tiamina pirofosfato a partir de, 555, 555*f*
vitamina B_{12}, 659, 660r-661r
deficiencia de, 691r, 688-691
vitamina B_2, 687
vitamina B_6, 688-689
deficiencia de, 689-691
vitamina C, deficiencia de, 128r-129r
vitamina D_3, **375**
como precursor hormonal, 375-377, 375*f*
vitamina E, **377**
como cofactor de oxidación-reducción, 377-378
vitamina K, **378**
como cofactor de oxidación-reducción, 377*f*, 378
vitaminas, **375**
VLCAD. *Véase* acil-CoA de cadena muy larga deshidrogenasa
VLDL. *Véase* lipoproteínas de muy baja densidad
V_m. *Véase* potencial de membrana
V_{max}. *Véase* velocidad máxima
von Euler-Chelpin, Hans, 534
von Mering, Josef, 901

W

Walker, John E., 729
Warburg, Otto, 545
warfarina (Coumadin), **236**, 377*f*, 378
WAT. *Véase* tejido adiposo blanco
Watson, James D., 97, 949
estructura del DNA de, 286-291, 289*f*, 290*f*, 981
Weizmann, Chaim, 557
Wieschaus, Eric F., 1152
Wilkins, Maurice, 288
Winkler, Hans, 319
Woese, Carl, 104, 1062
Woolley, D. Wayne, 524
Wurtz, Charles-Adolphe, 192
Wyman, Jeffries, 168

X

XALD. *Véase* adrenoleucodistrofia ligada a X
xantina oxidasa, **891**, 892*f*
inhibición de, 893, 893*f*, 894*f*
xenobióticos, **740**
metabolismo por enzima P-450 de, 740, 816r-817r
xeroderma pigmentosum (XP), 1007r-1008r, 1038
xilulosa 5-fosfato,
como regulador clave en el metabolismo de glúcidos y grasas, 592, 593*f*
en el ciclo de Calvin, 779, 781*f*, 782*f*
en la ruta de las pentosas fosfato, 565-566, 565*f*, 567*f*
xilosa, 246s
xilulosa, 246s
XP. *Véase* xeroderma pigmentosum

Y

YAC. *Véase* cromosomas artificiales de levadura
Yalow, Rosalyn, 900
Yonath, Ada E., 1082
Young, William, 538

Z

Zamenick, Paul, 1070
zanamivir (Retenza), 271, 272*f*
zeaxantina, 378*f*
zimógenos, **232**, 232*f*, 233-234
en la coagulación de la sangre, 234-236, 234*f*, 235*f*, 236*f*
Zocor. Véase simvastatina,
Zuckerkandl, Emile, 104
zwiteriones, 81
aminoácidos como, 81, 83*f*

COPY-STATION

1 **H** 1,008																	2 **He** 4,003
3 **Li** 6,94	4 **Be** 9,01											5 **B** 10,81	6 **C** 12,011	7 **N** 14,01	8 **O** 16,00	9 **F** 19,00	10 **Ne** 20,18
11 **Na** 22,99	12 **Mg** 24,31											13 **Al** 26,98	14 **Si** 28,09	15 **P** 30,97	16 **S** 32,06	17 **Cl** 35,45	18 **Ar** 39,95
19 **K** 39,10	20 **Ca** 40,08		21 **Sc** 44,96	22 **Ti** 47,90	23 **V** 50,94	24 **Cr** 52,00	25 **Mn** 54,94	26 **Fe** 55,85	27 **Co** 58,93	28 **Ni** 58,71	29 **Cu** 63,55	30 **Zn** 65.37	31 **Ga** 69,72	32 **Ge** 72.59	33 **As** 74.92	34 **Se** 78,96	35 **Br** 79,90	36 **Kr** 83,30
37 **Rb** 85,47	38 **Sr** 87,62		39 **Y** 88,91	40 **Zr** 91,22	41 **Nb** 92,91	42 **Mo** 95,94	43 **Te** 98,91	44 **Ru** 101,07	45 **Rh** 102,91	46 **Pd** 106.4	47 **Ag** 107,87	48 **Cd** 112,40	49 **In** 114,82	50 **Sn** 118,69	51 **Sb** 121,75	52 **Te** 126,70	53 **I** 126,90	54 **Xe** 131,30
55 **Cs** 132,91	56 **Ba** 137,34	57–70 *	71 **Lu** 174,97	72 **Hf** 178,49	73 **Ta** 180,95	74 **W** 183,85	75 **Re** 186,2	76 **Os** 190,2	77 **Ir** 192,2	78 **Pt** 195,09	79 **Au** 196,97	80 **Hg** 200,59	81 **Tl** 204,37	82 **Pb** 207,19	83 **Bi** 208,98	84 **Po** (209)	85 **At** (210)	86 **Rn** (222)
87 **Fr** (223)	88 **Ra** 226,03	89–102 **	103 **Lr** 262,11	104 **Rf** 261,11	105 **Db** 262,11	106 **Sg** 263,12	107 **Bh** 264,12	108 **Hs** 265,13	109 **Mt** 268	110 **Ds** 281	111 **Rg** 281	112 **Cn** 285	113 **Nh** 286	114 **Fl** 289	115 **Mc** 289	116 **Lv** 293	117 **Ts** 293	118 **Og** 294

*Lantánidos	57 **La** 138,91	58 **Ce** 140,12	59 **Pr** 140,91	60 **Nd** 144,24	61 **Pm** 144,91	62 **Sm** 150,36	63 **Eu** 151,96	64 **Gd** 157,25	65 **Tb** 158,93	66 **Dy** 162,50	67 **Ho** 164,93	68 **Er** 167,26	69 **Tm** 168,93	70 **Yb** 173,04
**Actínidos	89 **Ac** 227,03	90 **Th** 232,04	91 **Pa** 231,04	92 **U** 238,03	93 **Np** 237,05	94 **Pu** 244,06	95 **Am** 243,06	96 **Cm** 247,07	97 **Bk** 247,07	98 **Cf** 251,08	99 **Es** 252,08	100 **Fm** 257,10	101 **Md** 258,10	102 **No** 259,10

CopyStation

Fuentes bioinformáticas internacionales que proporcionan acceso a bases de datos, herramientas y bibliografía esencial para los practicantes de la bioquímica

National Center for Biotechnology Information (NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov
UniProt	www.uniprot.org
ExPASy Bioinformatics Resource Portal	www.expasy.org
GenomeNet	www.genome.jp

Algunas bases de datos útiles sobre estructura

Protein Data Bank (PDB)	www.pdb.org
EMDataBank Unified Resource for 3DEM	www.emdatabank.org
National Center for Biomedical Glycomics	http://glycomics.ccrc.uga.edu
LIPIDMAPS Lipidomics Gateway	www.lipidmaps.org
Nucleic Acid Database (NDB)	http://ndbserver.rutgers.edu
Modomics database of RNA modification pathways	http://modomics.genesilico.pl

Algunas fuentes y herramientas adicionales mencionadas en el texto

Structural Classification of Proteins database (SCOP2)	http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk
PROSITE Sequence logo	http://prosite.expasy.org/sequence_logo.html
ProtScale hydrophobicity and other profiles of amino acids	http://web.expasy.org/protscale
Predictor of Natural Disordered Regions (PONDR)	www.pondr.com
Enzyme nomenclature	www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme
Ensembl genome databases	www.ensembl.org
PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System	www.pantherdb.org
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	www.genome.jp/kegg
KEGG pathway maps	www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html
Biochemical nomenclature	www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature
Online Mendelian Inheritance in Man	www.omim.org

Abreviaturas de los aminoácidos

A	Ala	Alanina	N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asparagina o	P	Pro	Prolina
		aspartato	Q	Gln	Glutamina
C	Cys	Cisteína	R	Arg	Arginina
D	Asp	Aspartato	S	Ser	Serina
E	Glu	Glutamato	T	Thr	Treonina
F	Phe	Fenilalanina	V	Val	Valina
G	Gly	Glicina	W	Trp	Triptófano
H	His	Histidina	X	—	Desconocido o
I	Ile	Isoleucina			aminoácido no estándar
K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
L	Leu	Leucina	Z	Glx	Glutamina
M	Met	Metionina			o glutamato

Asx y Glx se utilizan en la descripción de resultados de procedimientos analíticos de aminoácidos en los que Asp y Glu no se distinguen fácilmente de sus correspondientes amidas, Asn y Gln.

COPY-STATION

Código genéticos estándar

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met*	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

*AUG también actúa como codón de inicio en la síntesis de proteínas.